

Aus der

Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. Virchow

Einfluss von T_H2-Zytokinen auf die Granzymsynthese in regulatorischen CD4⁺ T-Zellen

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Hilke Göttching, geboren am 19. März 1984 in Lübeck
aus Lübeck

Rostock, den 01.07.2011

Datum der Verteidigung: 11.04.2012

Dekan: Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Christian Virchow, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abteilung für Pneumologie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Jaster, Zentrum für Innere Medizin
Abteilung für Gastroenterologie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Barbara M. Bröker, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Greifswald

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
TABELLENVERZEICHNIS.....	III
ABKÜRZUNGEN.....	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 ALLERGIE	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Pathophysiologie	3
1.1.3 Die Rolle von Interleukin-4 bei allergischen Erkrankungen.....	5
1.2 REGULATORISCHE T-ZELLEN	7
1.2.1 Natürliche T_{regs}	8
1.2.2 Adaptive T_{regs}	10
1.2.3 T_{regs} und Granzym B	11
1.2.4 T_{regs} und Allergie.....	13
1.3 APOPTOSE	14
1.3.1 Die Granula-vermittelte Apoptose.....	15
1.3.2 Granzym B	16
1.3.3 Granzym A, Granzym K.....	18
1.3.4 Perforin.....	19
1.4 ZIELSETZUNG	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 MATERIAL UND REAGENZIEN.....	21
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	21
2.1.2 Chemikalien, Lösungen, Zellen und sonstige Reagenzien	22
2.1.3 Antikörper und Zytokine	23
2.2 PUFFER, KULTURMEDIENTEN, LÖSUNGEN.....	24
2.3 ISOLIERUNG, DIFFERENZIERUNG UND KULTIVIERUNG DER ZELLEN	25
2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-zentrifugation	25
2.3.2 Bestimmung der Zellzahl	27
2.3.3 Automatische magnetische Zellsortierung (autoMACS)	27
2.3.4 Reinheitsbestimmung mittels Durchflusszytometrie	29
2.3.5 Zellkulturen.....	29
2.3.6 Verarbeitung der Überstände und Herstellung von Zelllysaten.....	30
2.4 IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	31
2.4.1 Durchflusszytometrie	31
2.4.2 Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	33
2.4.3 Zytotoxizitätsassays	35
2.5 AUFBAU DER VERSUCHE	37
2.5.1 Versuchsblock I: Einfluss verschiedener Stimulationsprotokolle auf die Granzym-Synthese in $CD4^+$ T-Zellen	37
2.5.2 Versuchsblock II: Einfluss von IL-4 auf die Synthese zyto-toxischer Enzyme in adaptiven regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen	37
2.5.3 Versuchsblock III: Einfluss von IL-4 auf das zytotoxische Potential adaptiver regulatorischer $CD4^+$ T-Zellen.....	38
2.5.4 Versuchsblock IV: Einfluss von IL-4 auf die Sekretion von IL-10 und IFN- γ durch adaptive regulatorische $CD4^+$ T-Zellen	38

3	ERGEBNISSE	39
3.1	EXPRESSION VON GRANZYM A, B UND K IN ADAPTIVEN REGULATORISCHEN UND REGULÄR AKTIVIERTEN CD4 ⁺ ZELLEN.....	39
3.2	EINFLUSS VON INTERLEUKIN-4 AUF DIE EXPRESSION VON GRANZYM B IN ADAPTIVEN REGULATORISCHEN CD4 ⁺ ZELLEN	44
3.3	DER EINFLUSS VON IL-4 AUF DIE PERFORIN-EXPRESSION IN AT _{REGS}	50
3.4	EINFLUSS VON INTERLEUKIN-4 AUF DAS ZYTOTOXISCHE POTENTIAL ADAPTIVER REGULATORISCHER CD4 ⁺ ZELLEN	51
3.5	EINFLUSS VON INTERLEUKIN-4 AUF DIE INTERLEUKIN-10- UND IFN- γ -SYNTHESE IN ADAPTIVEN REGULATORISCHEN CD4 ⁺ ZELLEN.....	54
4	DISKUSSION	56
4.1	DIE INDUKTION ADAPTIVER REGULATORISCHER CD4 ⁺ ZELLEN DURCH STIMULATION VON CD3 UND CD46 IN VITRO UND IN VIVO	56
4.2	DIE BEDEUTUNG ZYTOTOXISCHER PROTEINE FÜR DIE FUNKTION REGULATORISCHER CD4 ⁺ T-ZELLEN	58
4.2.1	<i>Die Synthese von Granzym A, B und K in regulatorischen CD4⁺ Zellen.....</i>	58
4.2.2	<i>Die Rolle von Perforin.....</i>	60
4.3	BEEINFLUSSUNG DER GRANZYM-B-SYNTHESE IN ADAPTIVEN REGULATORISCHEN T-ZELLEN DURCH INTERLEUKIN-4	62
4.4	MÖGLICHE BEDEUTUNG FÜR DEN PATHOMECHANISMUS UND DIE THERAPIE ALLERGISCHER ERKRANKUNGEN	67
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	73
7	ANHANG	94
7.1	THESEN ZUR DISSERTATION	94
7.2	CURRICULUM VITAE.....	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
7.3	PUBLIKATION	96
7.4	DANKSAGUNG.....	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
7.5	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	97

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1-1: MASTZELLPRODUKTE UND IHRE WIRKUNGEN.....	3
ABB. 1-2: INTERLEUKIN-4 BEI IMMUNOLOGISCHEN REAKTIONEN.	6
ABB. 1-3: T _{REGS} HEMMEN VIELSTUFIG DIE TARGETZELLENTWICKLUNG	8
ABB. 1-4: IPEX-SYNDROM	9
ABB. 1-5: GRANZYM-B-VERMITTELTE FUNKTIONEN DER REGULATORISCHEN T-ZELLEN.....	12
ABB. 1-6: EIN MISSVERHÄLTNIS ZWISCHEN T _{R1} UND T _H -ZELLEN FÜHRT ZU ALLERGIEN UND.....	14
AUTOIMMUNERKRANKUNGEN	14
ABB. 1-7: WEGE DES GRANZYM-B-VERMITTELTEN ZELLTODES	17
ABB. 2-1: DICHTEGradientENZENTRIFUGATION	26
ABB. 2-2: REINHEITSBESTIMMUNG MIT DEM DURCHFLUSSZYTOMETER	29
ABB. 2-3: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON ENZYMEN IN T-ZELLEN.....	33
ABB. 3-1: GRÖÖSE UND GRANULARITÄT UNTERSCHIEDLICH STIMULIERTER CD4 ⁺ T-ZELLEN	40
ABB. 3-2: EXPRESSION VON CD25 AUF UNTERSCHIEDLICH STIMULIERTEN CD4 ⁺ T-ZELLEN.....	41
ABB. 3-3: GRANZYM-A-SYNTHESE IN UNTERSCHIEDLICH STIMULIERTEN CD4 ⁺ T-ZELLEN.....	41
ABB. 3-4: GRANZYM-B-SYNTHESE IN UNTERSCHIEDLICH STIMULIERTEN CD4 ⁺ T-ZELLEN.....	43
ABB. 3-5: GRANZYM-K-SYNTHESE IN UNTERSCHIEDLICH STIMULIERTEN CD4 ⁺ T-ZELLEN.....	43
ABB. 3-6: GRANZYM-B-PRODUKTION UNTER DEM EINFLUSS VON INTERLEUKIN-4 IM	
DURCHFLUSS-ZYTOMETER EINES PROBANDEN.....	45
ABB. 3-7: GRANZYM-B-EXPRESSION DER T _{REGS} UNTER DEM EINFLUSS VON INTERLEUKIN-4 IN	
ZELLYSATEN BEI RESPONDERN	46
ABB. 3-8: GRANZYM-B-SEKRETION DER T _{REGS} UNTER DEM EINFLUSS VON INTERLEUKIN-4 IN DEN	
ZELLÜBERSTÄNDEN BEI RESPONDERN.....	46
ABB. 3-9: GRANZYM-B-SYNTHESE IN DEN ZELLYSATEN BEI NONRESPONDERN	47
ABB. 3-10: GRANZYM-B-SYNTHESE IN DEN ZELLÜBERSTÄNDEN BEI NONRESPONDERN	47
ABB. 3-11: INTRINSISCHES INTERLEUKIN-4 BEI RESPONDERN UND NONRESPONDERN.....	48
ABB. 3-12: GRANZYM-B-SYNTHESE UNTER DEM EINFLUSS VON INTERLEUKIN-4	49
ABB. 3-13: HEMMUNG DER GRANZYM-B-SYNTHESE DURCH INTERLEUKIN-4	50
ABB. 3-14: BEEINFLUSSUNG DER PERFORINSYNTHESE UNTER INTERLEUKIN-4	51
ABB. 3-15: AT _{REGS} INDUZIEREN GRANZYM-B-ABHÄNGIG DEN ZELLTOD VON K562 ZELLEN	52
ABB. 3-16: KORRELATION ZWISCHEN DER GRANZYM-B-SYNTHESE IN AT _{REGS} UND DEREN	
ZYTOTOXISCHES POTENTIAL.....	53
ABB. 3-17: DAS ZYTOTOXISCHE POTENTIAL ADAPTIVER CD4 ⁺ T _{REGS} WIRD DURCH IL-4 SUPPRIMIERT ..	54
ABB. 3-18: EINFLUSS VON INTERLEUKIN-4 AUF DIE IFN- γ -SYNTHESE ADAPTIVER	
REGULATORISCHER CD4 ⁺ ZELLEN	55
ABB. 3-19: EINFLUSS VON INTERLEUKIN-4 AUF DIE INTERLEUKIN-10-SYNTHESE ADAPTIVER	
REGULATORISCHER CD4 ⁺ ZELLEN	55
ABB. 4-1: PHYSIOLOGIE VON CD46 IN VIVO.....	57
ABB. 4-2: GRANZYM-B-VERMITTELTE FUNKTIONEN DER REGULATORISCHEN T-ZELLEN.....	67

Tabellenverzeichnis

TAB. 2-1: FLUOROCHROME.....	31
TAB. 2-2: ANSÄTZE FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG	32
TAB. 2-3: VERSUCHSPARAMETER DER GRANZYM- UND ZYTOKIN-ELISA.	35

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
aT _{reg}	adaptive regulatorische T-Zelle
bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell scan</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde (Einsekundenkapazität)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gewichtskraft
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNF-like receptor</i>
GrA	Granzym A
GrB	Granzym B
GrK	Granzym K
HPE-Puffer	<i>high performance ELISA-Puffer</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
MNC	Zellen des mononucleären Systems
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
nT _{reg}	natürliche regulatorische T-Zelle
p	Signifikanz
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
r _p	Korrelationskoeffizient
SSC	<i>side scatter</i>
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H 1 bzw. T _H 2	T-Helferzelle Typ 1 bzw. Typ 2
TNF	Tumornekrosefaktor
TMB	Tetramethylbenzidin
T _R 1	Typ 1 adaptive regulatorische T-Zelle
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
U	<i>Units</i>
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen-Prozent
w/v	Gewicht/Volumen-Prozent
z.B.	zum Beispiel
z-AAD-cmk	Z-Ala-Ala-Asp-Chlormethylketon

1 Einleitung

1.1 Allergie

1.1.1 Definition

Eine Allergie ist eine überschießende immunologische Reaktion gegen eigentlich nicht pathogene, körperfremde Antigene, welche Allergene genannt werden. Der Körper reagiert mit einer Aktivierung des Immunsystems, welche sich in den typischen Symptomen wie Urtikaria, Rhinokonjunktivitis, allergisch-atopischer Dermatitis und Asthma bronchiale bis hin zur Anaphylaxie äußert. Allergien können durch Antikörper oder Zellen vermittelt sein. Die größte Gruppe der antikörpervermittelten Reaktionen stellt die IgE-abhängige Allergie vom Soforttyp dar (Kap. 1.1.2). Bei weiteren Formen dominieren andere Immunglobulintypen, wie zum Beispiel bei der Anaphylaxie und bei der Serumkrankheit das Immunglobulin G. Die unterschiedlichen immunologischen Reaktionen, die als Reaktion auf ein Allergen stattfinden, werden nach Coombs und Gell in vier Typen eingeteilt (Gell et al. 1968). Die Pathophysiologien dieser verschiedenen Reaktionstypen werden im Kapitel 1.1.2 erläutert, da sie ein gutes grundlegendes Verständnis schaffen. Zu beachten ist, dass das Modell aufgrund neuerer Erkenntnisse kritisiert wird, da es zwischen den Reaktionstypen fließende Übergänge gibt und meist mehr als nur ein Mechanismus an allergischen Erkrankungen beteiligt ist (Rajan 2003). Daher soll es nur dem Überblick dienen.

Allergische Erkrankungen sind in der westlichen Welt weit verbreitet und ihre Prävalenz steigt stetig (Weißbuch Allergie in Deutschland 2004). Laut WHO wird angenommen, dass zurzeit etwa 20% der Weltbevölkerung an einer IgE-vermittelten Allergie erkrankt sind (WHO 2002). In Deutschland liegen diese Zahlen noch deutlich höher. Allein unter Heuschnupfen leiden 13% der Kinder und 20% der Erwachsenen (RKI 2009).

Die Ätiologie des Geschehens ist weitgehend ungeklärt. Verschiedene Faktoren spielen eine entscheidende Rolle. Zu ihnen zählt die genetische Prädisposition. Kinder erkrankter Eltern haben ein erhöhtes Risiko Allergien zu entwickeln (Steinke et al. 2008). Burke et al. fassten 2003 zehn Studien zusammen: der positive prädiktive Wert

zwischen einer Asthmaerkrankung und positiver Familienanamnese (Verwandter 1. Grades erkrankt) liegt bei 11 bis 37%, der negative prädiktive Wert bei 86 bis 97%.

Die familiäre Prädisposition ist jedoch weder notwendig noch ausreichend, um eine allergische Erkrankung hervorzurufen (Burke et al. 2003). Die persönliche oder familiäre Prädisposition zur Produktion von IgE-Antikörpern begleitet von der Entwicklung typischer Symptome wie Asthma, Rhinokonjunktivitis oder Dermatitis wird mit dem Begriff Atopie bezeichnet. Die Bereitschaft des Körpers zur Entwicklung der Krankheitsbilder ist so hoch, dass bereits niedrig dosierte Allergene zum Auftreten von Beschwerden führen (Johansson et al 2004). In der westlichen Welt sind bis zu 40% der Bevölkerung betroffen. Die Krankheitsbilder des atopischen Formenkreises können dabei einzeln auftreten, meist liegen jedoch verschiedene allergische Erkrankungen in Kombination vor.

Neben dem Aspekt der genetischen Prädisposition wird in der „Hygienetheorie“ die Vermutung aufgestellt, dass eine geringe Anzahl von Infektionen im Kindesalter das Allergierisiko ansteigen lässt. In westlichen Ländern sind deutlich höhere Prävalenzen von Allergien zu verzeichnen als in Ländern mit geringeren hygienischen Standards (von Mutius 2008). Auffallend ist außerdem die pathophysiologische Ähnlichkeit zwischen der Parasitenabwehr und Allergien. Neben dem hohen IgE-Umsatz sind Degranulationen von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten sowie die Kontraktion von glatten Muskelzellen und der Paneth-Becherzellen sowohl bei allergischen Reaktionen als auch bei der Abwehr von Parasiten vorzufinden (Finkelman et al 1997). Bei in unseren Breiten nur noch selten vorhandenen parasitären Infektionen wird vermutet, dass bei dem „unterbeschäftigten“ Immunsystem Ausweichreaktionen wie Allergien stattfinden, bei denen eigentlich nicht pathogene Antigene eine IgE-vermittelte immunologische Reaktion analog einer Parasitenabwehr auslösen.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Kinder, die in ländlicher Umgebung groß geworden sind, seltener als Stadtkinder erkranken. Dies wurde 1999 in München anhand der ALEX-Studie untersucht. Kinder, die in frühen Jahren Kontakt zu Tierställen und unbehandelter Kuhmilch hatten, zeigten signifikant niedrigere Zahlen von allergischen Erkrankungen (Riedler et al. 2001).

Zusammenfassend stellen Allergien Überreaktionen des Immunsystems dar, welche ursächlich noch nicht endgültig aufgeklärt werden konnten.

1.1.2 Pathophysiologie

Typ I: Allergie vom Soforttyp

Die Hypersensitivitätsreaktion Typ I ist die häufigste der insgesamt vier verschiedenen Reaktionstypen. Sie tritt bei klassischen allergischen Erkrankungen wie Heuschnupfen, Urtikaria und Asthma bronchiale auf. Pathophysiologisch wird die Reaktion in drei Phasen eingeteilt. Zunächst gelangt das Allergen über Haut, Schleimhaut oder Gastrointestinaltrakt in den Körper. Viele Allergien werden durch eingeatmete Proteinallergene verursacht, die IgE-Reaktionen auslösen. Im respiratorischen Epithel kommen die Antigene mit dendritischen Zellen in Kontakt und werden durch diese präsentiert. Die Antigenpräsentierenden Zellen wandern in die regionalen Lymphknoten und stimulieren die Differenzierung von T-Lymphozyten zu T_H2 -Zellen (Lambrecht et al. 2000). Das von den B-Zellen nach Erstkontakt mit dem Allergen gebildete IgE bindet an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor auf Mastzellen, basophilen Granulozyten und Langerhans-Zellen. Findet nun ein Kontakt des an die Mastzelle gebundenen Antikörpers mit dem passenden Antigen statt, kommt es zur Polymerisierung des FcεRI-Rezeptors auf der Zelle. Komplexe intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen werden eingeleitet und die Freisetzung von Mediatoren wie unter anderem Histamin, Heparin und Serotonin aus den Granula sowie die Synthese von zahlreichen proinflammatorischen und regulatorischen Zytokinen folgen (Alvarez-Errico et al. 2009).

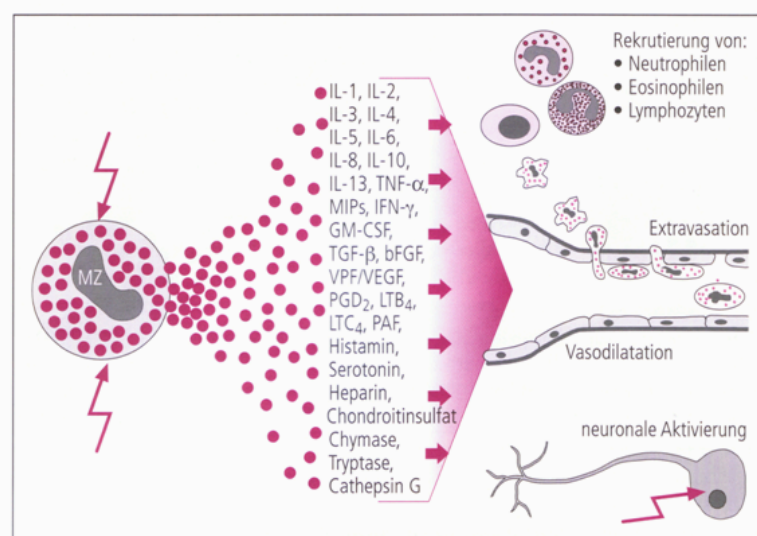


Abb. 1-1: Mastzellprodukte und ihre Wirkungen (Allergologie-Handbuch). In ihrer Gesamtheit wirken die Mediatoren chemotaktisch und erleichtern zudem durch Vasodilatation das Einwandern der Zellen ins Gewebe. Darüber hinaus bewirken die Botenstoffe eine neuronale Aktivierung.

Typ II: Zytotoxische Reaktion

Bei der Typ-II-Reaktion richten sich die Antikörper gegen zell- oder matrixassoziierte Antigene. Es gibt zwei verschiedene Reaktionsmechanismen. Die Antikörper können zur Aktivierung des Immunsystems mit anschließender Zerstörung der Zelle bzw. des Gewebes führen. Klassisch findet diese Reaktion zellassoziiert bei Transfusionsreaktionen (Sloop et al. 1995) oder medikamentenassoziiierter Neutropenie (Vandendries et al. 2006) statt, bei denen gebundene Zellen lysiert werden. Matrixassoziiert liegt dieses Geschehen beim Goodpasture-Syndrom vor (Remuzzi et al. 1993). Der zweite Reaktionsmodus tritt vor allem bei Autoimmunerkrankungen auf. Die Antikörper setzen an Rezeptoren des Körpers an und konkurrieren dort mit den physiologischen Stimuli. Sie führen entweder zu einer dauerhaften Stimulation der Rezeptoren (Morbus Basedow) oder zur kompetitiven Hemmung (Myasthenia gravis) (Weetman 2003 & Marouf et al. 2009). Die beiden Reaktionsformen innerhalb der Typ-II-Reaktion können auch kombiniert auftreten, so dass Antikörper gegen Rezeptoren vorliegen, die zusätzlich eine Aktivierung des Immunsystems auslösen. Der fulminanteste Verlauf einer Typ-II-Reaktion liegt bei hyperakuter Transplantatabstoßung vor.

Typ III: Immunkomplexreaktion

Im Gegensatz zu der zytotoxischen Reaktion (Typ II) werden bei der Typ-III-Reaktion Antikörper gegen lösliche Antigene gebildet, so dass diese frei im Blut zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe, so genannte Immunkomplexe, bilden. Die Komplexe lagern sich in den Geweben ab und verursachen dort eine entzündliche Reaktion, welche das Gewebe in seiner Funktion beeinträchtigt. Die Typ-III-Reaktion kann bei chronischen Entzündungen wie einer Virushepatitis, bei chronischer inhalativer Antigenexposition und bei der fulminant verlaufenden Serumkrankheit nach passiver Immunisierung mittels Tiereseren vorliegen.

Typ IV: Allergie vom verzögerten Typ

Als einziger der vier Reaktionstypen ist die Allergie vom verzögerten Typ zell- und nicht antikörpervermittelt. Aufgrund dessen ist sie durch erst nach vielen Stunden bzw. mehreren Tagen auftretende Symptome charakterisiert. Präformierte Antikörper können sehr schnell Reaktionen auslösen, wobei Zellen erst an den Ort des Geschehens gelangen müssen. Bei diesem Reaktionstyp bilden Haptene die Gruppe der Antigene.

Haptene werden erst durch Bindung von Proteinen zu Vollantigenen und erst dann vom Immunsystem erkannt (Basketter 1998). Aufgrund ihrer sehr kleinen Größe besitzen sie die Fähigkeit die Barriere der Haut zu überwinden. Dort werden sie von einer dendritischen Zelle (Langerhans-Zelle) phagozytiert (Banchereau et al. 1998). Diese durchwandern die Basalmembran und präsentieren das Antigen in regionären Lymphknoten, wodurch eine Aktivierung des Immunsystems ausgelöst wird. Es werden zwei gegensätzlich wirkende Zellreihen aktiviert, die anschließend in das Gewebe einwandern, in welchem Allergenkontakt bestand. Proinflammatorisch wirken die Interferon- γ -produzierenden $CD8^+$ T-Zellen. Sie stellen die Haupteffektorzellen dar und verursachen eine entzündliche Reaktion auf das Allergen. Deren Ausmaß wird durch regulatorische $CD4^+$ T-Zellen bestimmt. Sie wirken immunsuppressiv und reduzieren und regulieren die proinflammatorische Wirkung der $CD8^+$ T-Zellen mittels Interleukin-4 (Xu et al. 1996).

1.1.3 Die Rolle von Interleukin-4 bei allergischen Erkrankungen

Das Interleukin-4 ist eines der zentralen Zytokine bei allergischen Erkrankungen. Wie schon im Kapitel 1.1.2 bei der Pathophysiologie der IgE-vermittelten Sofortreaktion sowie der Allergie vom verzögerten Typ erläutert, spielt es eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen den verschiedenen T-Lymphozyten sowie mit den Antigenpräsentierenden Zellen. Das Zytokin ist der wirkungsvollste Auslöser einer Differenzierung naiver T-Helfer-Zellen zu $CD4^+$ T_H2 -Zellen (Hsieh et al. 1992 & Seder et al. 1992). Im Jahr 2000 veröffentlichten Julia et al. eine Studie an BALB/c-Mäusen, die mit dem Parasit *Leishmania major* infiziert wurden. Die Mäuse sind genetisch bedingt nicht in der Lage auf die Infektion mit einer notwendigen T_H1 -Antwort zu reagieren und bilden stattdessen fälschlicherweise IL-4, welches T_H2 -Zellen induziert. Diese Immunantwort kann die Infektion jedoch nicht bekämpfen und die Mäuse versterben. Einige der Tiere wurden mit Anti-IL-4-Antikörpern behandelt, woraufhin sie die erforderliche T_H1 -Reaktion zeigten und überlebten (Julia et al. 2000). Ohne die Wirkung des IL-4s konnten die Mäuse also korrekt auf die Infektion reagieren. Dies zeigt, dass das Zytokin der auslösende Faktor der T_H2 -Reaktion ist.

T_H2 -Zellen produzieren ebenfalls IL-4 und IL-13 und stabilisieren so eine Umgebung, in der die weitere Differenzierung von T_H2 -Zellen begünstigt wird. Außerdem werden

parallel dazu die T_H1 -Zellen in ihrer Immunantwort inhibiert. IL-4 wirkt demnach immunmodulatorisch.

Die Zytokine IL-4 und IL-13 bewirken darüber hinaus einen Isotypwechsel in den B-Zellen hin zur Produktion von IgE durch Phosphorylierung des Transkriptionsregulators STAT6, wodurch ein weiterer Teilaspekt allergischer Erkrankungen von dem Zytokin beeinflusst wird (Geha et al. 2003). Bei Mäusen, denen ein funktionsfähiges IL-4 fehlt, sind die T_H2 -Reaktionen und auch der Isotypwechsel gestört (Zhu et al. 2001).

Interleukin-4 sensibilisiert außerdem Mastzellen und basophile Granulozyten gegenüber IgE, indem es die Zellen zu einer verstärkten Expression des IgE-Rezeptors $Fc\epsilon RI$ anregt (Pawankar et al. 1997). Die Zellen können mehr Immunglobulin E binden. Das Zytokin nimmt somit nicht nur Einfluss auf die Produktion von IgE sondern auch auf dessen Wirkung.

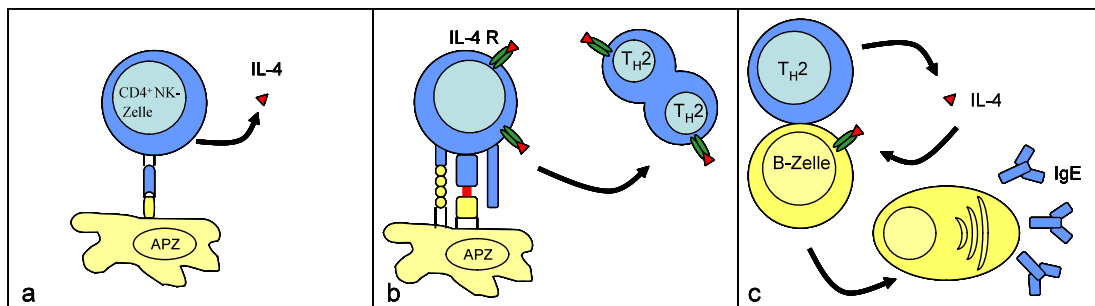


Abb. 1-2: Interleukin-4 bei immunologischen Reaktionen (Immunobiology). a) Aktivierung von $CD4^+$ NK-Zelle durch Antigen-präsentierende Zelle (APZ). Die NK-Zellen sezernieren daraufhin IL-4. b) Naive $CD4^+$ Zellen entwickeln sich nach dem Binden des IL-4 am IL-4-Rezeptor (IL-4 R) zu T_H2 -Zellen. c) Aktivierte T_H2 -Zellen produzieren IL-4 und induzieren damit den Isotypwechsel zu IgE.

Bei der Vielzahl von Interaktionen des Zytokins im Verlauf der Allergie-typischen T_H2 -Reaktion, liegt es nahe zu untersuchen, ob Unterschiede im Stoffwechsel des IL-4 bei Atopikern und Nicht-Atopikern vorliegen. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl im Serum als auch in der Bronchoalveolären Lavage erhöhte IL-4-Konzentrationen bei Allergikern vorliegen (Daher et al. 1995 & Walker et al. 1994) und dass Monozyten im peripheren Blut von Atopikern auf Hausstaubmilben mit einer überschießenden IL-4-Produktion reagieren (Leonard et al. 1997). Patienten mit allergischen Erkrankungen zeigen zudem allgemein höhere Zahlen IL-4-produzierender Zellen im Blut (Chan et al. 1996). Bereits bei Neugeborenen atopischer Eltern konnten in den Lymphozyten höhere Konzentrationen des Zytokins festgestellt werden als bei Kindern nicht-atopischer Eltern (Piccinni et al. 1996). Genpolymorphismen, die im IL-4-Promoter oder IL-4-

Rezeptor liegen bzw. Strukturen betreffen, die die Wirkung von IL-4 beeinflussen, stehen im engen Zusammenhang mit dem Auftreten von Allergien (Song et al. 1996, Hershey et al. 1997, Mitsuyasu et al. 1998, Burchard et al. 1999 & Kruse et al. 1999). Diese Tatsache könnten Aspekte der genetischen Prädisposition erklären.

Das komplexe Wirken des IL-4s in beinahe jedem Schritt der immunologischen Reaktion sowie die Veränderungen von Zytokinkonzentrationen sowie der Zahlen IL-4-produzierender Zellen im Blut zeigt dessen fundamentale Rolle bei allergischen Erkrankungen.

1.2 Regulatorische T-Zellen

Die Immunabwehr ist ein überaus komplexes System mit vielen ineinander greifenden Bestandteilen, welches einer differenzierten Regulation bedarf. Die T-Zellen bilden in ihrer Gesamtheit einen Bestandteil der zellulären Abwehr, wobei die Untergruppen jeweils unterschiedliche Funktionen erfüllen. Schon seit den 70er Jahren ist bekannt, dass es Zellen gibt, die andere in ihrer Funktion hemmen. Zunächst schrieb man diese Funktion den $CD8^+$ T-Suppressor-Zellen zu (Gershon et al. 1972). Aufgrund von mangelnden Erkenntnissen über Klassifizierung und spezifischen Markern wurde deren Existenz angezweifelt (Moller 1988). Seit den 90er Jahren sind nun die regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) als immunsuppressiv wirkende Zellen bekannt. Sie sind charakterisiert durch CD4- und CD25-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Suri-Payer et al. 1998 & Jonuleit et al. 2001).

Gemein ist den verschiedenen Untergruppen regulatorischer T-Zellen (s.u.), dass sie IL-10 und TGF- β sezernieren und über diesen Mechanismus immunsuppressiv wirken. Interleukin-10 unterdrückt T-Zell-Antworten, indem es die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-2, TNF- α und IL-5 hemmt. TGF- β blockiert ebenso die Zytokinproduktion, reduziert darüber hinaus aber auch die Zellteilung und Zytotoxizität der T-Zellen (Maloy et al. 2003). Abb. 1-3 zeigt die Angriffspunkte in der Zellentwicklung von $CD4^+$, $CD8^+$ sowie B-Zellen an denen T_{regs} inhibierend Einfluss nehmen. Die Effekte werden dabei nicht alleine IL-10 und TGF- β zugeschrieben.

Mehrere Studien beweisen die enorme Bedeutung der regulatorischen T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen (Sakaguchi et al. 1985), Transplantationen (Chai et al. 2005) und Allergien (Akbari et al. 2003). Im Allgemeinen nehmen die Zellen bei Erkrankungen, die auf immunologischen Reaktionen basieren, eine entscheidende Rolle

ein. Bei Abwesenheit der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β kommt es zu einem gehäuftem Auftreten von Autoimmunerkrankungen aufgrund mangelnder Hemmung der autoreaktiven Zellen (Piccirillo et al. 2002). Bei vollkommener Abwesenheit der T_{regs} tritt im Vergleich jedoch ein deutlich aggressiver und fulminanter verlaufendes Krankheitsbild auf (Kap. 1.2.1), so dass die Wirkung der Zytokine nur eine Teilfunktion der Zellen darstellen kann. Die T_{regs} können größtenteils auch ohne die Zytokine ihre Wirkung ausüben (Piccirillo et al. 2002). Demnach müssen die Zellen neben der Synthese von IL-10 und TGF- β über weitere Mechanismen regulierend Einfluss nehmen, welche noch nicht im Detail aufgeklärt sind.

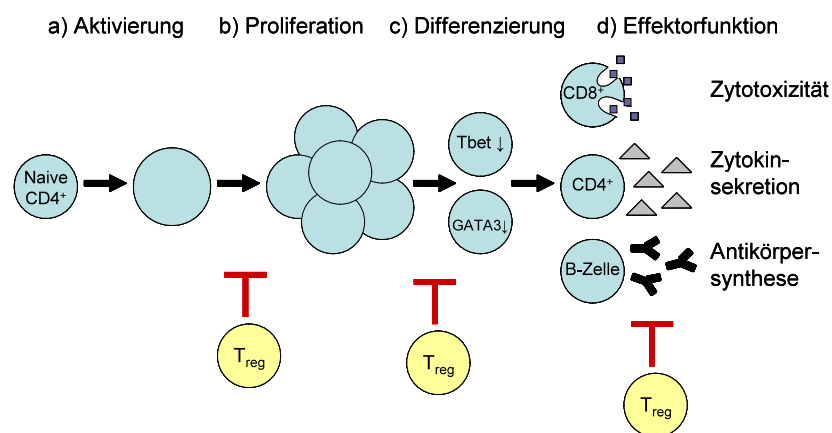


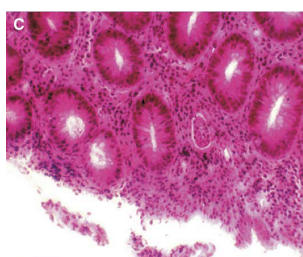
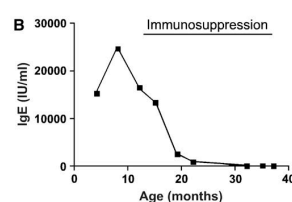
Abb. 1-3: T_{regs} hemmen vielstufig die Targetzellentwicklung (Sojka et al. 2008). a) Die T_{regs} scheinen keinen Einfluss auf die Aktivierung der CD4⁺ Zellen zu nehmen. b) T_{regs} supprimieren - vermutlich über eine Hemmung der IL-2-Synthese - die Proliferation der Zellen. c) T_{regs} verkürzen die Dauer des T-Zell-Rezeptor-Signals und inhibieren das Ablesen der Transkriptionsfaktoren Tbet und GATA3. Sie hemmen dadurch die Differenzierung der Zellen. d) T_{regs} inhibieren die Freisetzung zytotoxischer Enzyme sowie die Synthese von Zytokinen (v.a. IFN- γ und IL-4) und Antikörpern.

1.2.1 Natürliche T_{regs}

Natürliche T_{regs} (nT_{regs}) werden im Thymus produziert und stellen etwa 10-15% der CD4⁺ T-Zellen in den lymphatischen Organen (Sakaguchi et al. 1995). Schon bei ihrer Entwicklung werden sie auf den regulatorischen Werdegang festgelegt. Ihr exakter Entwicklungsmechanismus ist nicht bekannt (Hsieh et al. 2004, Pacholczyk et al. 2007 & Wong et al. 2007). Sicher ist, dass sie hemmenden Einfluss auf Zellen nehmen, die sich gegen körpereigene Strukturen richten. Dadurch wird die Immuntoleranz gegenüber Körperbestandteilen gewährleistet. Mäuse, die in frühen Lebenstagen

thymektomiert wurden, entwickeln durch das Fehlen dieser Zellpopulation zahlreiche autoimmune Erkrankungen, die durch progressive inflammatorische Zerstörung der Gewebe charakterisiert sind (Asano et al. 1996).

Es gelang bisher nur eingeschränkt die regulatorischen T-Zellen zu klassifizieren. Die Oberflächenmoleküle wie CD25, CTLA-4, GITR (glucocorticoid-induced TNF-like receptor), OX40 (CD134) und L-Selektin (CD62L) sind sehr uneinheitlich vorhanden, ermöglichen jedoch die Zellisolation zu Forschungszwecken (Suri-Payer et al. 1998 & Jonuleit et al. 2001). Die Stimulation an GITR bewirkt ein Erlöschen der zellkontakt-abhängigen suppressiven Funktion der Zellen (Shimizu et al. 2002 & Ji et al. 2004). Problematisch ist, dass diese Marker die Aktivität von $CD4^+$ Zellen anzeigen, jedoch nicht spezifisch für regulatorische Zellen sind. Der Marker Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) ist ein Transkriptionsfaktor. Er verhindert die Aktivierung des IL-2-Gens und wirkt dadurch antiproliferativ (Hori et al. 2003 & Kim et al. 2006). Er wurde zunächst als T_{reg} -spezifisch angesehen, welches allerdings widerlegt worden ist. Er wird auch von aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen exprimiert (Morgan et al. 2005). FoxP3 ist sowohl bei natürlichen als auch bei adaptiven T_{regs} vorzufinden. Mäuse, bei denen ein Defekt dieses Transkriptionsfaktors vorlag, entwickelten ein fulminantes lymphoproliferatives autoimmunes Syndrom und starben nach 4-5 Wochen (Brunkow et al. 2001).



Ein ähnliches Krankheitsbild besteht bei Patienten, bei denen eine Mutation in dem FoxP3-Gen vorliegt. Das so genannte IPEX-Syndrom (**I**mmundysregulation, **P**olyendokrinopathie, **E**nteropathie, **X**-chromosomal vererbt) ist ein sehr seltenes, durch den Vererbungsmodus ausschließlich beim männlichen Geschlecht auftretendes Krankheitsbild, was ebenfalls durch aggressive Autoimmunität gekennzeichnet ist (Wildin et al. 2001). Bei beiden, Mäusen sowie Menschen, fehlt die immunsuppressive Wirkung der regulatorischen T-Zellen. Dieser Defekt kann bei den Mäusen durch die Transfusion $CD4^+CD25^+FoxP3^+-nT_{regs}$ behoben werden, so dass die Mäuse überlebten (Nishimura et al. 2004). FoxP3 scheint somit die Funktion der T_{regs} entscheidend zu beeinflussen.

Abb. 1-4: IPEX-Syndrom (Chatila 2005).

A Ekzematöse Hautläsionen bei einem Kind mit IPEX. **B** IgE-Werte des Kindes im Verlauf über 3 Jahre. Immunsuppressive Therapie erfolgte ab dem 2. Lebensmonat. **C** Enteritis-ähnliche Erkrankung bei IPEX. Biopsie aus dem Sigma. Gemischte Zellinfiltrate sind sichtbar.

Grundlegend üben die nT_{regs} ihre Funktion über verschiedene Mechanismen aus. Zu den inhibitorischen Botenstoffen zählen die schon erwähnten Zytokine IL-10 und TGF- β . Darüber hinaus können T_{regs} auch über Zell-Zell-Kontakte regulierend wirken. Es konnte nachgewiesen werden, dass dabei vor allem das Oberflächenmolekül CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) der nT_{regs} beteiligt ist (Takahashi et al. 2000) und Interaktionen mit dendritischen Zellen stattfinden. Des Weiteren wird eine Erhöhung des cAMP-Levels durch nT_{regs} in den Zielzellen diskutiert, welcher zu einer Inhibition der Genexpression von Zytokinen, unter anderem IL-2 und IFN- γ , führt (Bopp et al. 2007). Interleukin-2 dient den Zielzellen als Wachstumsfaktor und stimuliert die Proliferation der Zellen. Eine Hemmung dessen Synthese wirkt dementsprechend antiproliferativ. Auch die Wirkung durch Granzym B zählt zu den zellkontaktabhängigen Mechanismen, welche im Kapitel 1.2.3 detailliert erläutert werden. Die Bedeutung der einzelnen Wirkungsmechanismen der nT_{regs} konnte noch nicht endgültig aufgeklärt werden und bedarf weiterer Forschung. Unklar ist, wann die Zellen welchen Mechanismus nutzen und wie diese aktiviert und reguliert werden.

1.2.2 Adaptive T_{regs}

Im Gegensatz zu den nT_{regs} entstehen die adaptiven regulatorischen T-Zellen (aT_{regs}) außerhalb des Thymus. Sie entwickeln sich in Anwesenheit von IL-10 oder TGF- β im peripheren Lymphsystem aus naiven $CD4^+$ T-Zellen (Chen et al. 2003). Sie produzieren ebenso wie die natürlichen T_{regs} IL-10 und TGF- β und besitzen die Oberflächenmarker CTLA-4 und GITR, die auch bei der natürlichen Zellform vorliegen. Die Parallelitäten lassen ähnliche Wirkmechanismen vermuten. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von FoxP3 ist uneinheitlich beschrieben worden (Fehérvari et al. 2004 & Vieira et al. 2004).

Die aT_{regs} lassen sich in verschiedene Untergruppen einteilen. Die so genannten T_H3 -Zellen gehören dem mukosalen Immunsystem an und produzieren zusätzlich zu IL-10 und TGF- β noch IL-4. Sie werden durch Antigenpräsentation aktiviert und hemmen Reaktionen auf die in den Grenzflächenschleimhäuten z.B. im Darm vorliegenden Mikroorganismen. Sie tragen somit zur oralen Toleranz bei (Saurer et al. 2009).

Eine weitere Untergruppe stellen die so genannten T_R1 -Zellen dar. Sie können in vitro erzeugt werden, kommen in dieser Form vermutlich aber auch in vivo vor. Sie

sezernieren große Mengen von IL-10, was ihr Hauptcharakteristikum darstellt. In unterschiedlichen Mengen synthetisieren sie TGF- β , IFN- γ und IL-5, jedoch kein oder sehr wenig IL-2 und IL-4 (Groux et al. 1997). Die in-vitro-Stimulation durch Antigenpräsentierende Zellen unter dem Einfluss von IL-10 bewirkt eine Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu den T_R1-Zellen (Roncarolo et al. 2001). Die gleiche Wirkung zeigt auch die Inkubation der Zellen mit Vitamin D3 und Dexamethason (Mucida et al. 2007 & Barrat et al. 2002). Die unter dem Einfluss von IL-10 differenzierten T_R1-Zellen vermehren sich nach Antigen-Stimulation nur langsam (Groux et al. 1997 & Roncarolo et al. 2001).

Ein weiteres Verfahren T_R1-Zellen zu induzieren, welches auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde, beschrieben Kemper et al. 2003. Die Stimulation von CD3 und CD46 an naiven CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 bewirkt eine Differenzierung von Zellen, deren Zytokinprofil mit den T_R1-Zellen übereinstimmt. Sie vermehren sich im Gegensatz zu den unter IL-10 differenzierten Zellen stark. Die Synthese großer Mengen von IL-10 verhält sich bei beiden Zellpopulationen gleich. Sie wirken ausgeprägt inhibitorisch auf koinkubierte CD4⁺ Zellen. Die mittels Anti-CD3 und -CD46 induzierten T_R1-Zellen wurden regulär aktivierten CD4⁺ Zellen gegenüber gestellt. Die Zellen lassen sich durch Stimulation mittels Anti-CD3 und -CD28 induzieren. Diese wiesen keine IL-10-Synthese und ebenso keine inhibitorische Wirkung auf (Kemper et al. 2003). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden im Versuchsblock I regulär aktivierte CD4⁺ Zellen zu Vergleichen herangezogen (Kap. 2.5.1).

Price et al. stellten 2005 fest, dass Streptokokken über das M-Protein in der Lage sind, am CD46-Rezeptor zu binden und darüber die Zellen zur Synthese von IL-10 und Granzym B (Kap. 1.2.3 & 1.3.2) zu stimulieren. Die Induktion der Zellen via CD46 ist somit nicht nur in vitro, sondern auch in vivo ein Mechanismus der Zelldifferenzierung.

1.2.3 T_{regs} und Granzym B

Da die IL-10- und TGF- β -induzierte Suppression nur zum Teil die Funktion der regulatorischen T-Zellen erklärt (Piccirillo et al. 2002), wurde nach weiteren Regulationsmechanismen der Zellen gesucht. Grossman et al. beschrieben 2004 (A), dass adaptive regulatorische T-Zellen (Kap. 1.2.2) Granzym B produzieren und mit dessen Hilfe in der Lage sind, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zu töten. Der Wirkmechanismus

des Granzym B wird in Abschnitt 1.3.2 detailliert erläutert. Diese Theorie konnte ein Jahr später anhand eines Mäusemodells auch für die natürlichen T_{regs} bestätigt und ergänzt werden (Gondek et al. 2005).

Zhao et al. erweiterten 2006 die These der suppressiven Funktion der Zellen mittels Granzym B durch die Annahme, dass T_{regs} nicht nur in der Lage sind T-Lymphozyten dadurch zu regulieren, sondern dass sie ebenso zytotoxisch auf weitere Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems wirken, insbesondere auf die B-Lymphozyten.

Mit Hilfe von Granzym B reduzieren die T_{regs} autoimmune Reaktionen (Qin et al. 2006), senken die Tumorcarence (Cao et al. 2007) und sind an der Aufrechterhaltung von Toleranz bei Transplantationen beteiligt (Gondek et al. 2008). Damit ist die Granzym-B-vermittelte Wirkung der regulatorischen T-Zellen bei beinahe allen bislang bekannten Funktionen der Zellen beteiligt. Zurzeit nicht bekannt ist die Bedeutung dieses Mechanismus bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises.

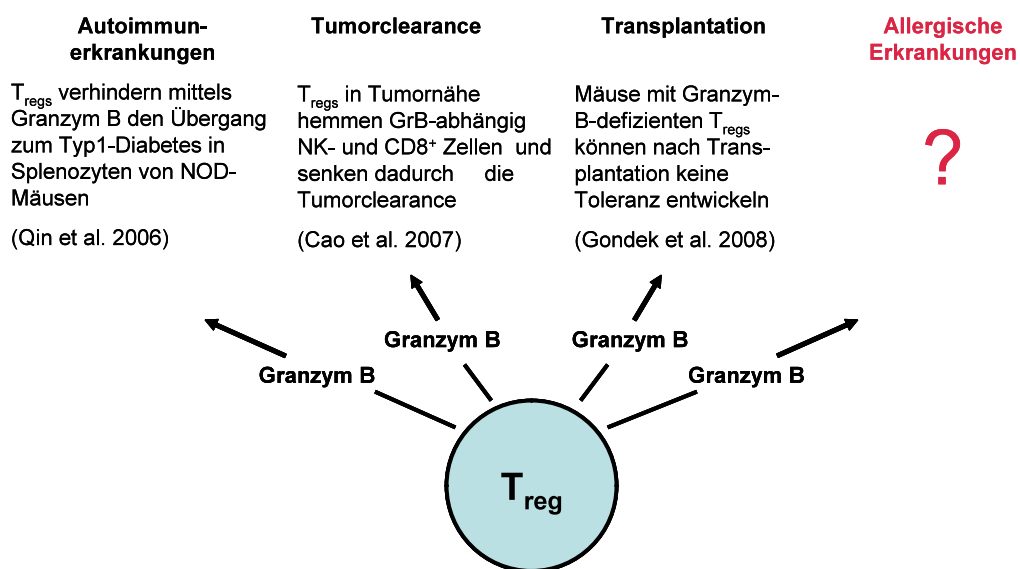


Abb. 1-5: Granzym-B-vermittelte Funktionen der regulatorischen T-Zellen. Die Bedeutung von Granzym-B-vermittelter Immunsuppression konnte in den vergangenen Jahren bereits durch Qin et al. 2006, Cao et al. 2007 sowie Gondek et al. 2008 in Bezug auf Autoimmunerkrankungen, Tumorcarence und Transplantation gezeigt werden. Die Bedeutung des Enzyms bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises ist bislang nicht bekannt.

Der Mechanismus der Granzym-B-vermittelten Apoptose wird im Kapitel 1.3.2 ausführlich erläutert.

1.2.4 T_{regs} und Allergie

Allergien entstehen auf der Grundlage einer Überreaktion des Immunsystems gegenüber Antigenen, die eigentlich nicht als pathogen anzusehen sind. Es wird vermutet, dass regulatorische T-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit andere Zellen zu hemmen, eine entscheidende Rolle spielen. Die verminderte Induktion natürlicher T_{regs} und/oder T_H1-Zellen in frühen Lebensjahren verursacht laut Wills-Karp et al. (2001) die steigende Inzidenz allergischer Erkrankungen. Die wichtige Funktion der regulatorischen T-Zellen bei immunologischen Krankheitsbildern zeigt, dass Patienten, die an dem oben genannten IPEX-Syndrom leiden, diverse autoimmun-endokrine sowie allergische Erkrankungen, unter anderem ein ausgeprägtes Ekzem, erhöhte IgE-Konzentrationen, Eosinophilie und Nahrungsmittelallergien, zeigen. Eine reduzierte Funktion der Zellen scheint somit bei den Erkrankungen eine tragende Rolle zu spielen. Monozyten des PMS (Peripheren Monozyten Systems) allergischer bzw. atopischer Patienten zeigen höhere Proliferationsraten und Synthesen von T_H2-Zytokinen als gesunde Probanden. Bei Monozyten gesunder Probanden, aus denen die regulatorischen CD25⁺ Zellen depletiert wurden, stiegen diese Parameter anschließend an (Taams et al. 2002 & Ling et al. 2004). Dies lässt vermuten, dass bei gesunden Individuen eine T_{reg}-gesteuerte Unterdrückung der Allergen-vermittelten Immunantwort stattfindet.

Bei Allergikern liegt eine Dysbalance des Immunsystems mit seinen pro- und antiinflammatorischen Regulationsmechanismen vor. Akdis et al. stellten 2004 fest, dass die Zahl IL-10-produzierender T_{regs} bei gesunden Probanden deutlich höher ist als bei Allergikern. In umgekehrter Weise verhält sich die Anzahl IL-4-synthetisierender T_H2-Zellen. Interleukin-10 beeinflusst viele Zellen, die mit allergischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Es hemmt die T_H2-Aktivierung, Mastzellen (Arock et al. 1996 & Royer et al. 2001), eosinophile Granulozyten (Takanaski et al. 1994) und den Isotypwechsel in den B-Zellen von IgG zu IgE (Nouri-Aria et al. 2004 & Jeannin et al. 1998). Bei Neugeborenen von Müttern mit erhöhten Zahlen von T_H2-Zellen und wenigen T_R1-Zellen konnten bereits im Nabelschnurblut erhöhte IgE-Werte festgestellt werden (Hinz et al. 2010). Bei der Regulation des Immunsystems scheint das Verhältnis zwischen den IL-10-synthetisierenden T_R1-Zellen und den T_H2-Zellen von großer Bedeutung zu sein (Veldman et al. 2006). Auf der Basis eines Missverhältnisses zwischen den Zellen entwickeln sich Allergien und Autoimmunerkrankungen. Je größer

das Verhältnis zwischen den Zellen ist, desto höher ist die inhibitorische Komponente, so dass Allergien unterdrückt werden.

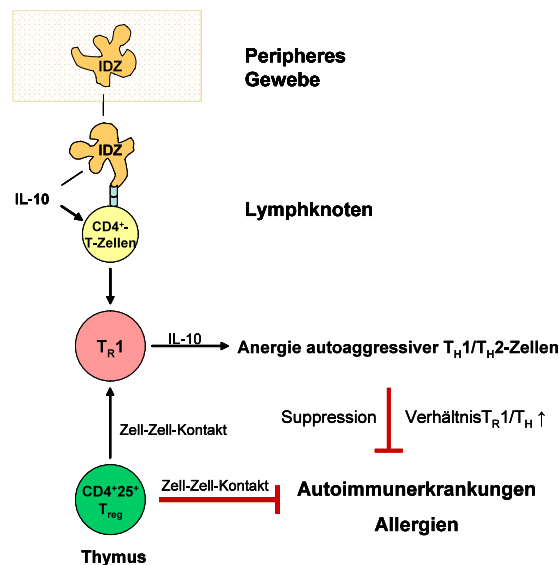


Abb. 1-6: Ein Missverhältnis zwischen T_R1 und T_H-Zellen führt zu Allergien und Autoimmunerkrankungen (Veldman et al. 2006). Sowohl natürliche (CD4⁺25⁺ T_{reg}) als auch adaptive (T_R1) regulatorische Zellen supprimieren T_H-Zellen. Bei steigenden Zahlen von T_H-Zellen und / oder sinkenden Zahlen regulatorischer Zellen besteht ein Missverhältnis, so dass die überschießenden immunologischen Reaktionen bei Allergien und Autoimmunerkrankungen nicht unterdrückt werden können.

Zudem zeigen mehrere Studien, dass bei Patienten mit Heuschnupfen und bei Atopikern die suppressive Wirkung der T_{regs} auf die Synthese von T_H2-Zytokinen nur eingeschränkt möglich ist (Ling et al. 2004, Grindebacke et al. 2004 & Bellinghausen et al. 2003). Dabei ist unklar, ob Funktionseinbußen der T_{regs} vorliegen, das Missverhältnis zwischen den beiden Zelltypen ursächlich ist oder die T_H2-Zellen refraktär gegenüber den T_{regs} sind.

1.3 Apoptose

Der eukaryote Organismus verfügt über Mechanismen, die den Tod überflüssiger, beschädigter oder infizierter Zellen herbeiführen (Kerr et al. 1972). Die Apoptose, der so genannte programmierte Zelltod, stellt einen wichtigen Mechanismus dar, der der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dient. Ein Gleichgewicht zwischen der Differenzierung neuer Zellen und dem Absterben alter Zellen wird gewährleistet. Virus-infizierte- sowie Tumorzellen können ebenfalls durch diesen Mechanismus eliminiert

werden, er stellt somit auch einen Bestandteil der Abwehrreaktion des Immunsystems dar (Jacobson et al. 1997).

Der genetisch programmierte Zelltod kann durch verschiedene Auslöser aktiviert werden. Zu diesen zählen zytotoxische Lymphozyten, der Mangel von Wachstumsfaktoren oder Hormonen, verschiedene Umwelteinflüsse wie Strahlung und Hitze sowie das Aufheben von Zell-Zell-Kontakten nach dem Herauslösen von Zellen aus ihrem Zellverband (Ueda et al. 1994). Ebenso können chemische Faktoren wie Zytostatika und Steroide medizinisch eingesetzt werden, um das Auslösen der Apoptose therapeutisch zu nutzen (Thompson et al. 1994).

Morphologisch stellt sich die Apoptose zunächst als Zell- und Kernpyknose in Verbindung mit Chromatinkondensation dar. Das Zytoplasma schrumpft und die intrazellulären Bestandteile werden in so genannte Apoptosekörperchen verpackt, welche anschließend von umliegenden Phagozyten aufgenommen und verdaut werden. Das Geschehen verläuft in einer vorgeschriebenen, programmierten Abfolge und verursacht keine inflammatorische Reaktion. Dem gegenübergestellt wird die Nekrose, die durch irreversible morphologische Veränderungen gekennzeichnet ist. Diese verlaufen schnell und ungeordnet und führen zu einem inflammatorischen Prozess mit resultierender Schädigung des umliegenden Gewebes (Krysko et al. 2008).

Die Apoptose kann durch drei verschiedene Mechanismen ausgelöst werden: über Fas- und TNF-Rezeptoren sowie Granula-vermittelt. Binden der Fas-Ligand am Fas-Rezeptor und Zytokine wie TNF- α am TNF-Rezeptor, findet zwischen den so genannten „death-Rezeptoren“ eine Kreuzverbindung statt und die darauf folgende Aktivierung von Caspasen führt zur Auflösung diverser Zellbestandteile, resultierend im Zelltod (Lüthi et al. 2007 & Adams 2003). Die Granula-vermittelte Apoptose wird von zytotoxischen Lymphozyten genutzt und aufgrund ihrer Bedeutung für diese Arbeit im Folgenden näher erläutert.

1.3.1 Die Granula-vermittelte Apoptose

Bei diesem vor allem durch zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) genutzten Mechanismus steht die Synthese von Granula bzw. Lysosomen im Vordergrund. In diesen Vesikeln werden Substanzen gespeichert, die bei Exozytose den Zelltod in anderen Zellen auslösen. Nach Aktivierung durch eine Antigenpräsentierende Zelle kommt es zur raschen Polarisierung des Zentrums der Mikotubuli, auch Zentrosom oder MTOC (microtubule organizing center) genannt

(Geiger et al. 1982, Kupfer et al. 1984 & Kupfer et al. 1985). Die Granula wandern daraufhin entlang der Mitosespindel in Richtung der so genannten immunologischen Synapse, welche die Kontaktfläche zwischen zytotoxischer Zelle und Zielzelle darstellt (Shresta et al. 1998, Griffiths 2003 & Kupfer et al. 1983). Nach Kontakt zwischen den beiden Zellen formiert sich durch Anlagerung von Talin und Adhäsionsmolekülen eine zirkuläre Struktur, die das Zentrosom stabilisiert (Stinchcombe et al. 2001 & Vyas et al. 2002). In dem Zentrum der Zell-Zell-Kontaktstelle befindet sich der „central supramolecular activation complex“ (cSMAC), durch den die Granula wandern bevor sie ausgeschüttet werden (Stinchcombe et al. 2001). Das Zentrosom interagiert mit der Plasmamembran am cSMAC und befördert die Granula in den interzellulären Spalt (Stinchcombe et al. 2006). Die Hauptbestandteile der Granula sind Perforin und Granzyme, die durch verschiedene Mechanismen innerhalb von 20 Minuten den Zelltod herbeiführen (Rothstein et al. 1978). Das Ergebnis dieser gesamten Abläufe ist ein Wirken der Substanzen in einem begrenzten Raum ohne weitere Zellen zu beschädigen. Die zytotoxischen Zellen sind nach Ablauf des Geschehens schnell in der Lage weitere Zellen zu töten.

1.3.2 Granzym B

Granzym B stellt einen Hauptbestandteil der Granula zytotoxischer Zellen. Dieses Granzym besitzt eine hohe Substratspezifität (Masson et al. 1987) und führt zum schnellen und effizienten Zelltod (Heusel 1994 & Pardo et al. 2004). Granzym B zählt zu den Aspartasen, da es ähnlich den Caspasen seine Substrate nach der Aminosäure Aspartat spaltet. Das Enzym wirkt über zwei verschiedene Mechanismen zytotoxisch. Zum einen spaltet und aktiviert Granzym B direkt Caspasen. Zu diesen zählen die Caspasen-3 und -6 bis -10 (Martin et al. 1996, Medema et al. 1997 & Gu et al. 1996). Die Caspase-3 spaltet und aktiviert dann wiederum andere Caspasen (Adrain et al. 2005). Weitere Substrate der Caspase sind die Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP), ein DNA-Reparaturenzym, sowie der Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD) (Thomas et al. 2000). Durch die Aktivierung der Caspasen wird der Zelltod-Mechanismus in Gang gesetzt und eine rasche Apoptose, DNA-Fragmentierung und zellmorphologische Veränderungen eingeleitet. Granzym B ist das einzige Caspase-aktivierende Granzym.

Bei dem zweiten Mechanismus über den Granzym B zytotoxisch wirkt, erhöht das Enzym die Permeabilität der Mitochondrien durch Oligomerisierung der Membran-

bestandteile BAX und BAK (Luo et al. 1998 & Li et al. 1998). BAX und BAK zählen zu der Familie der Bcl-2-Proteine. Aufgrund der Permeabilitätszunahme können Proteine des intermembranösen Raumes wie das Cytochrom c in das Zytosol entweichen (Kuwana et al. 2002). Dieses bewirkt die Bildung von Apoptosomen, welche Komplexe zwischen dem zytosolischen Protein APAF-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1), ATP und Caspase-9 darstellen (Nijhawan et al. 1997 & Jiang et al. 2000). Durch diesen Vorgang wird die Caspase-9 aktiviert, die nun ihrerseits rasch weitere Caspasen aktiviert, die den schnellen Zelltod herbeiführen (Slee et al. 1999 & Hill et al. 2004).

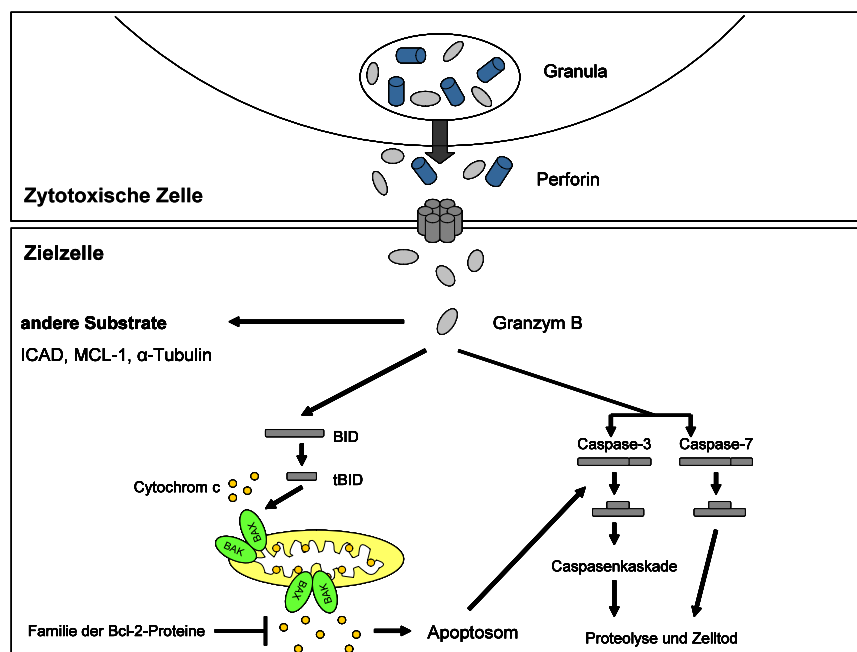


Abb. 1-7: Wege des Granzym-B-vermittelten Zelltodes (Cullen et al. 2008). Granzym B gelangt aus den Granula der zytotoxischen Zelle in die Zielzelle und löst dort über zwei Hauptwege Proteolyse und Zelltod aus. Zum einen oligomerisiert es BAX und / oder BAK in der äußeren Mitochondrienmembran und führt dadurch zur Freisetzung des Cytochroms c. Dieses bildet im Zytosol Komplexe mit dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (APAF-1), ATP und Caspase-9, welche Apoptosomen genannt werden. Dadurch wird die Caspase-9 aktiviert und löst eine Aktivierung weiterer Caspasen aus, welche den Zelltod herbeiführen. Proteine der Bcl-2-Familie können den Ausstrom von Cytochrom c hemmen und wirken somit antiapoptotisch. Granzym B kann als zweiten Weg direkt die Caspase-3 und Caspase-7 aktivieren, welche ebenso wie die Caspase-9 weitere Enzyme ihrer Klasse aktivieren und dadurch zur Proteolyse und anschließendem Zelltod führen.

Das antiapoptotisch wirkende Protein Bcl-2 kann durch Heterodimerisierung BAX und BAK inaktivieren und dadurch das Ausströmen von Cytochrom c unterdrücken (Kluck et al. 1997). Ein vermehrtes Vorkommen des Proteins kann die Apoptose der Zelle verhindern (Davis et al. 2000), wohingegen Caspase-Inhibitoren den Zelltod

verlangsamen, aber nicht aufhalten können (Pinkoski et al. 2001 & Waterhouse et al. 2006). Dieses lässt vermuten, dass Granzym B Caspase-unabhängig über die Permeabilitätszunahme der Mitochondrien die Apoptose induziert und Caspasen den Mechanismus lediglich beschleunigen. Welcher der beiden Mechanismen der bevorzugte Weg ist, bleibt umstritten (Pinkoski et al. 2001, Sutton et al. 2003, Waterhouse et al. 2005 & Metkar et al. 2003).

1.3.3 Granzym A, Granzym K

Granzym A leitet eine langsame Form der Apoptose ein (Masson et al. 1986), bei der die Zielzellen Oligonukleotidfragmente freisetzen (Shi et al. 1992 A & B). Der Zelltod ist charakterisiert durch Einzelstrangbrüche der DNA anstelle von Doppelstrangbrüchen wie sie bei der durch Granzym B induzierten Apoptose vorliegen (Beresford et al. 1999). Darüber hinaus ist weder eine Verlangsamung der Reaktion durch Caspaseinhibitoren noch eine Blockierung bei Überexpression von Bcl-2 festzustellen, was dafür spricht, dass Granzym A einen anderen Wirkmechanismus nutzt als Granzym B (Beresford et al. 1999 & Fan et al. 2003 A).

Die Substrate des Enzyms SET, HMGB2 und APE1 sowie die Tumorsuppressorproteine pp32 und NM23-H1 bilden zusammen einen an das Endoplasmatische Retikulum gekoppelten Komplex, den so genannten SET-Multiproteinkomplex (Beresford et al. 1997, Beresford et al. 2001, Fan et al. 2002, Fan et al. 2003 A & B). Granzym A wandert direkt nach seinem Eintritt in die Zelle in den Zellkern und aktiviert dort die DNase NM23-H1, welche die Einzelstrangbrüche herbeiführt, und inaktiviert gleichzeitig dessen Inhibitor SET (Fan et al. 2003 A). Die Exonuklease TREX1 verhindert das erneute Zusammenschließen der DNA-Fragmente (Chowdhury et al. 2006). Es wird vermutet, dass Granzym A in der Zelle oxidativen Stress verursacht und dadurch der Substratkomplex in den Zellkern wandert (Fan et al. 2003 B & Shi et al. 1992 B).

Granzym K wirkt vermutlich in einer ähnlichen Art und Weise wie Granzym A über das Freisetzen reaktiver Sauerstoffspezies (MacDonald et al. 1999). SET ist ebenfalls ein Substrat von Granzym K und es bewirkt ebenso Einzelstrangbrüche durch NM23-H1 (Zhao et al. 2007 A). Darüber hinaus scheint Granzym K aber auch ähnlich dem Granzym B über Mitochondrien zu wirken (Zhao et al. 2007 B). Diesem Mechanismus wird allerdings nur geringe Bedeutung zugesprochen.

1.3.4 Perforin

Die Anwesenheit von Perforin in den Granula zytotoxischer Zellen konnte bereits 1985 von Podack et al. festgestellt werden. Perforin an sich ist kein zytotoxisches Enzym. Es ermöglicht den zytotoxischen Enzymen durch Porenbildung den Durchtritt durch Zellmembranen (Tschopp et al. 1986 & Sauer et al. 1991). Dabei ist bislang unklar, ob Perforin den Eintritt der Enzyme in die Zelle fördert (Tschopp et al. 1986, Sauer et al. 1991, Shiver et al. 1991, Shiver et al. 1992 & Nakajima et al. 1995) oder ob es die Freisetzung der Granzyme aus Endosomen bewirkt, in die diese zunächst aufgenommen und gespeichert werden (Froelich et al. 1996 & Shi et al. 1997). Beide Theorien werden sehr widersprüchlich diskutiert, da weder die eine noch die andere eindeutig bewiesen werden konnte. Der Verdacht, dass Granzym B Perforin-unabhängig über einen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor aufgenommen wird (Motyka et al. 2000), wurde mehrfach bestritten (Trapani et al. 2003 & Dressel et al. 2004). Mehrere Studien zeigen eine Perforin-Abhängigkeit der Granula-vermittelten Apoptose (Kagi et al. 1994, Lowin et al. 1994 & Kojima et al. 1994). Eine weitere Annahme ist, dass die Aufnahme der Granzyme in die Endosomen ladungsabhängig ist und Perforin lediglich für deren Ausschüttung benötigt wird (Shi et al. 2005 & Bird et al. 2005). Keefe et al. vermuteten 2005, dass Perforin die Aufnahme der Enzyme in besonders große Vesikel ermöglicht, indem es anschließend die Zellwand repariert, so dass der Prozess der Apoptose trotz großer Membrandefekte möglich ist und die Nekrose umgangen werden kann.

Ob der Apoptoseweg, den regulatorische Zellen nutzen, Perforin-abhängig oder -unabhängig ist, wird ebenso widersprüchlich diskutiert (Zou 2006). Grossman et al. vermuteten 2004 (A), dass T_{regs} einen Perforin-abhängigen Mechanismus nutzen, um zytotoxisch zu wirken. Dem widersprachen Gondek et. al 2005 indem sie zeigten, dass sich die suppressive Wirkung der Zellen bei An- und Abwesenheit von Perforin nicht unterschied.

Die Abhängigkeit der zytotoxischen Enzyme von Perforin scheint je nach Situation und Zellform unterschiedlich zu sein und ist bislang weitestgehend nicht aufgeklärt.

1.4 Zielsetzung

Allergien sind immunologische Überreaktionen auf eigentlich nicht pathogene Antigene. Der Antigenkontakt bewirkt eine Differenzierung von T_H2 -Zellen, eine erhöhte IgE-Synthese und Ausschüttung von Mediatoren aus Mastzellen und basophilen Granulozyten. Regulatorische T-Zellen nehmen vermutlich mit ihrer suppressiven Wirkung eine zentrale Rolle bei Allergien ein. Sie scheinen ihre Funktion nicht oder nicht ausreichend ausüben zu können und lassen demnach die Reaktionen ungehemmt zu. Welche Funktionseinbußen sie bei Allergien konkret haben, ist weitestgehend nicht erforscht. In dieser Arbeit soll die Synthese von Granzymen in adaptiven regulatorischen T-Zellen analysiert und mit der Enzymsynthese regulär aktivierter $CD4^+$ Zellen verglichen werden. Dazu werden $CD4^+$ T-Zellen aus dem Vollblut gesunder Probanden isoliert und zu adaptiven T_{regs} bzw. regulär aktivierten $CD4^+$ Zellen induziert. Anschließend wird die Synthese der Granzyme A, B und K nach 1- bis 3-tägiger Inkubation mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Darüber hinaus soll der Einfluss des T_H2 -Zytokins Interleukin-4 auf die Granzym-Synthese in adaptiven T_{regs} analysiert werden. IL-4 nimmt eine zentrale Rolle im Allergiegeschehen ein und die Blutspiegel des Zytokins sind bei Allergikern erhöht. Für die Analyse werden ebenfalls $CD4^+$ T-Zellen gesunder Probanden isoliert. Die Zellen werden daraufhin teils ohne den Einfluss des Zytokins sowie unter dem Einfluss ansteigender IL-4-Konzentrationen (0,1 – 100 ng/ml) zu adaptiven T_{regs} differenziert. Anschließend erfolgt die Konzentrationsbestimmung der synthetisierten Granzyme mittels ELISA und Durchflusszytometrie.

Da die Menge eines synthetisierten Granzyms nicht direkt Rückschlüsse auf die Funktion einer Zelle liefert, soll ebenfalls der Einfluss des Interleukins-4 auf die Zytotoxizität der adaptiven regulatorischen T-Zellen analysiert werden. Es werden die unter und ohne IL-4-Einfluss differenzierten T_{regs} mit Granzym-sensitiven K562 Zellen co-inkubiert. Anhand eines auf Durchflusszytometrie basierenden Zytotoxizitätsassays soll deren zytotoxisches Potential verglichen werden.

Neben der Wirkung von IL-4 auf die Granzym-Expression sollen zusätzlich die Auswirkungen auf die Synthese von Interleukin-10 und Interferon- γ analysiert werden, um zu untersuchen, welche Funktionen der adaptiven T_{regs} sich unter dem Einfluss von Interleukin-4 verändern.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Reagenzien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Blutabnahme

- EDTA-Monovette S-Monovette 7,5 ml K3E, Sarstedt AG, Nümbrecht
- Multiadapter, Sarstedt AG, Nümbrecht
- Perfusionsbesteck, BD-Valu-Set, Becton Dickinson, Heidelberg

Brutschrank

- Brutschrank, Binder, Tuttlingen

Sterilbank

- S@felow 1.2, Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden

Magnetische Zellseparation

- AutoMACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
- Filter:
 - Acrodisc Syringe Filters, Pall Corporation, Ann Arbor, USA
 - Dualex Ultra, 0,22 µm Filter Unit, Millipore, Carrigtwohill, Irland
- Magnetsäulen (autoMACS Separating Columns), Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
- Parafilm „M“, Laborfilm, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

Durchflussszytometrie

- Durchflussszytometer FACSCalibur mit Software CellQuest Pro, Becton-Dickinson, Heidelberg und PC PowerMAC G4, Apple, USA
- FACS-Röhrchen (PS-Röhrchen), 0,6 ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- FACS-Röhrchen (BD Falcon), 5 ml, BD Biosciences, Heidelberg

ELISA

- ELISA-Reader EL800, Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall

Mikroskopie

- Mikroskop mit Planachromat-Objektiven, Carl-Zeiss, Jena
- Zählkammer Neubauer Improved, Fa. Brand, Wertheim

Vortex

- Vortex-Genie 1, Touch Mixer, Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
- Vortex-Mixer VM-300, Neolab Migge, Heidelberg

Zentrifugen

- Labofuge 400R Function Line mit den Rotatoren 3325B, 8177, 8179 und den Einsätzen 8172, Heraeus, Kendro, Osterode
- Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Schüttler

- Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau

Pipetten

- Kolbenhubpipetten Eppendorf Research, verschiedene Volumina, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettenspitzen Ep-T.I.P.S. mit Filter, versch. Volumina, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettierhilfe Easypet, Eppendorf AG, Hamburg
- Serologische Pipette, 25 ml, steril, Greiner Bio-One, Frickenhausen

Reaktionsgefäße

- 1,5 ml und 2,0 ml Easy CAP Reagiergefäße, farblos, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
- 15 ml und 50 ml PP-Röhrchen steril, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- ELISA-Platte, 96 Kavitäten, *high binding*, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- Zellkulturplatten, 24 Kavitäten, Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.2 Chemikalien, Lösungen, Zellen und sonstige Reagenzien

- 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), Beckman-Coulter, Krefeld
- Automatische magnetische Zellsortierung: CD4 MicroBeads, CD 14 MicroBeads, CD4⁺ T Cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
- Aqua ad injectabilia, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
- Biocoll Separating Solution, Dichte=1,077, Biochrom AG, Berlin
- CFSE, Invitrogen, Karlsruhe
- D-PBS (phosphate-buffered saline) ohne CaCl₂ und MCl₂, 500 ml, Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
- EDTA, 0,5 M, steril, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- EGTA, Calbiochem, Darmstadt

- ELISA-Sets:
 - IL-4, IL-10, Granzym B, IFN- γ , Immunotools GmbH, Friesoythe
 - Human Perforin ELISA PRO kit, Mabtech AB Biotechnologie, Hamburg
- Ethanol, 96%ig, Zentralapotheke Universität Rostock
- FACS Clean, Rinse und Flow, Reinigungs- und Durchlaufflüssigkeiten für das Durchflusszytometer, Becton Dickinson, Heidelberg
- K562-Zellen, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig
- Paraformaldehyd, Zentralapotheke Universität Rostock
- RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin, Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
- Saponin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Türk-Lösung zur Leukozytenzählung, Merck KGaA, Darmstadt
- z-AAD-cmk, Calbiochem, Darmstadt

2.1.3 Antikörper und Zytokine

Zellkultur

- Anti-CD46, Immunotools GmbH, Friesoythe
- Anti-CD28, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
- Anti-CD3, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
- Anti-IL-4, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
- IgG₁ Kontrollantikörper, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
- IL-4, Immunotools GmbH, Friesoythe

Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Markierung	Hersteller
CD3	SK7	IgG1	PerCP	BD, Heidelberg
CD4	MEM-241	IgG1	FITC	Immunotools
CD25	ACT-1	IgG1	PE	Dako, Hamburg
Kontrollantikörper IgG	203	IgG1	PE	Immunotools
Granzym A	CB9	IgG1	PE	BD, Heidelberg
Granzym B	GB11	IgG1	PE	Immunotools
Granzym K	24C3	IgG1	PE	Immunotools

2.2 Puffer, Kulturmedien, Lösungen

Zellisolation, Zellkultur und Zelllyse

- Kulturmedium: RPMI-Medium 1640 + 10% FCS + Penicillin (100 U/ml)
+ Streptomycin (100 µg/ml)
- Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (v/v), pH 8
- Waschpuffer: PBS, 2 % FCS_{inakt}

Automatische magnetische Zellsortierung

- Puffer A: PBS + 5 mM EDTA + 0,5% FCS
- Puffer B: PBS + 5 mM EDTA

Durchflusszytometrie

- Fixativ: 4 % Paraformaldehyd in PBS
- Permeabilisierungspuffer: 0,1 % Saponin in Waschpuffer
- Waschpuffer: PBS, 2 % FCS_{inakt}.

Sandwich-ELISA

- 10 x PBS Stammlösung:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml
pH	7,4
- Bindungspuffer: 1x PBS
- Waschpuffer: 1x PBS + 0,05% Tween 20 (v/v)
- Verdünnungspuffer: 1x PBS + 1% BSA (w/v)
+ 0,05% Tween20 (v/v)
- Blockpuffer : 1x PBS + 2% BSA (w/v)
- Enzym: Streptavidin-Poly-Meerrettich-Peroxidase
- Substratpuffer (Lösung A): 30 mM Kaliumdihydrogencitrat, pH 4,1
mit KOH

- Substratstammlösung (Lösung B): bei 2-8 °C dunkel gelagert 3 Monate haltbar.

Ethanol (96 %)	45 ml
Aceton	5 ml
Tetramethylbenzidin	120 mg
H ₂ O ₂ (30 %ig)	100 µl
- Substratgebrauchslösung (Lösung C): vor Gebrauch frisch angesetzt
10 ml Lösung A + 0,5 ml Lösung B
- Puffer 1: 1 x HPE-Puffer
- Puffer 2: 1x HPE-Puffer + je 1% Maus- und Rinderserum
- Stopplösung: H₂SO₄ 2,0 M

Zytotoxizitätsassay

- Kulturmedium 1:
 - RPMI-1640 + 2% FCS + Penicillin (100 U/ml) + Streptomycin (100 µg/ml) + 2 mM L-Glutamin + 50 µM Mercapto-Ethanol
- Kulturmedium 2:
 - RPMI-Medium + 10% FCS + Penicillin (100 U/ml) + Streptomycin (100 µg/ml)
- Waschpuffer:
 - PBS + 2 % FCS_(inakt.)

2.3 Isolierung, Differenzierung und Kultivierung der Zellen

2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten sind die zellulären Bestandteile des menschlichen Blutes. Monozyten und Lymphozyten bilden gemeinsam die Zellen des mononukleären Systems. Die unterschiedlichen Zellpopulationen unterscheiden sich unter anderem in ihrer Dichte und können aufgrund dieser voneinander separiert werden. Die Gewichtskraft bei der Zentrifugation bewirkt, dass sich Bestandteile größerer Dichte weiter unten als Bestandteile geringerer Dichte ablagern. Das verwendete Medium Ficoll, auf das die Zellen geschichtet werden, besitzt

eine Dichte von 1,077 g/ml. Aufgrund ihrer geringeren Dichte lagern sich die Zellen des mononukleären Systems nach Zentrifugation in der Interphase direkt über der Ficoll-Schicht ab. Die Thrombozyten verbleiben über der Interphase im Plasmaüberstand, während die Erythrozyten und Granulozyten wegen ihrer höheren Dichte durch das Ficoll hindurch sedimentieren.

Das venöse EDTA-Blut der gesunden Probanden wurde mit sterilem PBS 1:2 verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Ficoll pipettiert. Die anschließende Zentrifugation (630 g, 25 min, ungebremst) beschleunigte die Sedimentation der Zellen entsprechend ihrer Dichte. Die trübe Interphase wurde abpipettiert und mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation (400 g, 10 min) wurde der Überstand dekantiert und die Zellen erneut in 50 ml sterilem PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wiederholte sich dreimal. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und es folgte die Bestimmung der Zellzahl.

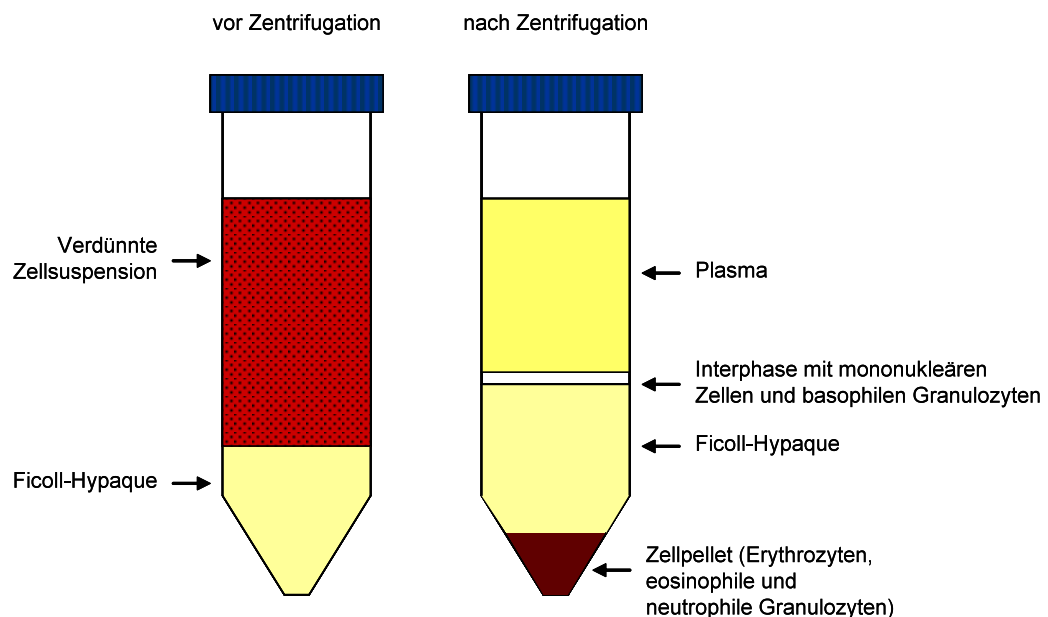


Abb. 2-1: Dichtegradientenzentrifugation. Links: Auf das Ficoll geschichtete verdünnte Zellsuspension vor der Zentrifugation. Rechts: Nach der Zentrifugation: Die Monozyten befinden sich in der weiß dargestellte Interphase. Diese wird entnommen und weiter verarbeitet.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Türk-Färbung. Das Gentianaviolett der Türk-Lösung färbt die Zellkerne an. Es wurden je nach erwarteter Zellzahl 10 μ l Zellsuspension mit 90 μ l oder 990 μ l Türk-Lösung vermischt, so dass eine Konzentration von 1:10 oder 1:100 entstand. Nach Durchmischung auf dem Vortex und einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 10 μ l der gefärbten Zellsuspension auf eine Neubauer-Improved-Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop vier Großquadrate ausgezählt.

2.3.3 Automatische magnetische Zellsortierung (autoMACS)

Jede Zelle des menschlichen Blutsystems hat spezifische Oberflächenmarker, die sie charakterisieren und unterscheiden. Gegen diese verschiedenen Antigene können Antikörper synthetisiert werden, die somit nur Zellen binden, deren Oberfläche dieses Molekül trägt. Die automatische magnetische Zellsortierung macht sich diese Tatsache zunutze, indem Antikörper mit magnetischen Beads, winzigen Partikeln, gekoppelt werden. Alle Zellen, an die der gekoppelte Antikörper bindet, können durch magnetische Kräfte von der Zellsuspension getrennt werden. Nach Bindung der Antikörper an die zelltypischen Antigene werden die Antigen-Antikörper-Mikropartikel-Komplexe an einer Magnetsäule vorbeigeführt und durch das Magnetfeld von den Zellen getrennt, die aufgrund des fehlenden Antigens keinen Antikörper tragen. Die Zellseparation kann anhand zwei unterschiedlicher Verfahren erfolgen. Bei der Positiv-Selektion binden die Antikörper direkt an den gesuchten Zellen und separieren diese von den Restlichen. Anders geschieht dies bei der Negativ-Selektion, bei der ein Cocktail aus verschiedenen Antikörpern hinzugefügt wird. Diese binden in ihrer Gesamtheit alle Zellen bis auf die Gesuchten. Der Unterschied liegt darin, dass bei der Positiv-Selektion die Zellen, welche weiterverarbeitet werden sollen, den Antikörper gebunden haben. Dies könnte theoretisch zu einer Zellaktivierung führen. Mittels der Negativ-Selektion kann dieses Problem umgangen werden. Allerdings ist die Reinheit der isolierten Zellen nach einer Positiv-Selektion häufig höher.

Bei den Versuchen wurden die CD4⁺ Zellen auf unterschiedliche Weise isoliert. Bei den Versuchsblöcken I und II (Kap. 2.5.1 und 2.5.2) wurden CD4 MicroBeads verwendet, die somit direkt an die CD4⁺ T-Zellen binden (Positiv-Selektion). Um die Reinheit der CD4⁺ T-Zellen zu erhöhen, wurden zunächst die Monozyten (ebenfalls CD4⁺) mittels CD14 MicroBeads aus der Zellsuspension entfernt und erst danach die CD4 Micro

Beads hinzugegeben. Es erfolgten demnach zwei Positiv-Selektionen: zunächst der CD14⁺ Monozyten und anschließend aus der verbliebenen Zellsuspension die der CD4⁺ Zellen.

Für die Zytotoxizitätsassays wurden die Zellen mittels Negativ-Selektion isoliert. Es wurde das „T Cell Isolation Kit II“ verwendet. Bei diesem Verfahren werden in zwei Schritten Antikörper hinzugegeben, die alle Zellen bis auf die CD4⁺ Zellen binden.

Bei der in Versuchsblock I und II (Kap. 2.5.1, 2.5.2) genutzten Positiv-Selektion mittels CD4 MicroBeads (Kap. 2.1.3) wurden die mononukleären Zellen nach Zählung und anschließender Zentrifugation (400 g, 10 min) in 80 µl/10⁷ Zellen Puffer A (2.2) resuspendiert. Entsprechend der Zellzahl (Kap. 2.3.2) wurden 15 µl/10⁷ Zellen CD14 MicroBeads hinzugegeben. Eine 15-minütige Inkubation bei 4°C folgte. Ein Waschvorgang mit 30 ml Puffer A entfernte die freien Antikörper. Nach Zentrifugation (400 g, 10 min) konnten die Zellen in 500 µl Puffer A resuspendiert und dem auto-MACS-Gerät zur Zellsortierung zugeführt werden. Die verbliebene Zellsuspension wurde aufgefangen und gezählt (Kap. 2.3.2). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 80 µl/10⁷ Zellen Puffer A resuspendiert und 15 µl/10⁷ Zellen CD4 MicroBeads hinzugegeben. Eine 15-minütige, gekühlte Inkubation folgte. Die Zellen wurden zentrifugiert, in 500 µl Puffer A resuspendiert und mithilfe des autoMACS-Geräts separiert.

Bei der Negativ-Selektion durch das T Cell Isolation Kit II (Kap. 2.1.3) in dem Versuchsblock III (Kap. 2.5.3) wurden die Zellen in 40 µl/10⁷ Zellen Puffer A resuspendiert. 10 µl/10⁷ Zellen Biotin-Antikörper-Cocktail wurden hinzugefügt und mit den Zellen über 10 Minuten gekühlt inkubiert. Anschließend wurden ohne Waschvorgang und Zentrifugation direkt 30 µl/10⁷ Zellen Puffer A und Anti-Biotin MicroBeads (20 µl/10⁷ Zellen) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation über 15 Minuten bei 4°C. Anschließend wurden die freien Antikörper durch einen Waschvorgang (30 ml Puffer A, Zentrifugation bei 400 g, 10 min) entfernt. Die Zellen konnten anschließend in 500 µl Puffer A resuspendiert und dem autoMACS-Gerät zugeführt werden.

Die isolierten Zellen wurden nach beiden Verfahren gezählt (Kap. 2.3.2), deren Reinheit im Durchflusszytometer bestimmt (Kap. 2.3.4) und anschließend kultiviert (Kap. 2.3.5). Beide Verfahren zur Isolierung der CD4⁺ T-Zellen lieferten vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Reinheit. Auch auf die Generierung und Funktion der adaptiven CD4⁺ T_{regs} hatte die Wahl des Isolierungsverfahrens keinen Einfluss.

2.3.4 Reinheitsbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Nach der Isolierung der $CD4^+$ Zellen wurde deren Reinheit bestimmt. Für die weiteren Versuche wurden nur Zellgemische von einer Reinheit über 90 % verwendet. Zu 10 μ l der isolierten Zellen in 50 μ l PBS wurden Fluorochrom-markierte Antikörper (Kap. 2.1.3), die gegen die spezifischen Oberflächenmarker CD3 und CD4 der $CD4^+$ Zellen gerichtet sind, hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden die Zellen mit Waschpuffer (Kap. 2.2) von den freien Antikörpern befreit und konnten so der Messung im Durchflusszytometer zugeführt werden. Nur Zellen, die sowohl CD3- als auch CD4-positiv sind, gehören der Population der $CD4^+$ Zellen an.

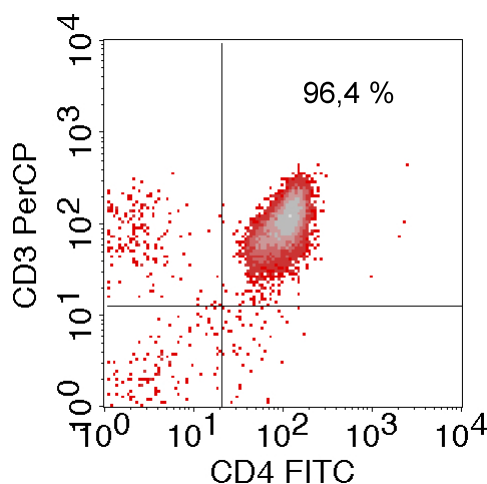


Abb. 2-2: Reinheitsbestimmung mit dem Durchflusszytometer. Dargestellt sind beispielhaft die Zellen eines Probanden nach der Isolation mittels Zentrifugation und AutoMacs. 96,4 % der Zellen befinden sich im rechten oberen Quadranten und sind damit sowohl $CD4^+$ als auch $CD3^+$. Der Zelldetritus und Zellen anderer Morphologie befinden sich in den restlichen Quadranten und bilden nur 3,6 % der Gesamtzellen.

2.3.5 Zellkulturen

Die Zellen wurden nach ihrer Isolierung für ein bis drei Tage inkubiert. 12 Stunden bevor die Zellen auf die Kulturplatte aufgetragen werden sollten, wurde diese mit Antikörpern beschichtet. Die Antikörper (Kap. 2.1.3) unterschieden sich je nach Zelltyp, der in der Kultur aus den $CD4^+$ Zellen induziert werden sollte. Adaptive regulatorische T-Zellen entwickeln sich aus $CD4^+$ Zellen durch die Stimulation der CD3 und CD46 Oberflächenantigene (Kemper et al. 2003). Zur regulären Aktivierung der $CD4^+$ Zellen wurden Antikörper gegen CD3 und CD28 hinzugefügt.

Die Kavitäten für die Induktion der adaptiven regulatorischen CD4⁺ Zellen enthielten 10 µg/ml CD3-Antikörper und 5 µg/ml CD46-Antikörper in PBS. Zur Stimulation der regulär aktivierten CD4⁺ Zellen wurden anstelle der CD46-Antikörper Anti-CD28 derselben Konzentration verwendet.

Die am Folgetag isolierten (Kap. 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3) Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) in die mit Antikörpern beschichteten Kavitäten pipettiert.

Bei den Versuchsblöcken II, III und IV (Kap. 2.5) wurde teilweise IL-4 (Kap. 2.1.3) hinzugegeben, um dessen Wirkung auf die adaptiven T_{regs} zu analysieren. Dabei wurden Ansätze erstellt, die unterschiedliche Konzentrationen (100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml) IL-4 enthielten. Bei weiteren Versuchen wurde ein gegen IL-4 gerichteter Antikörper (Kap. 2.1.3) dem Ansatz beigefügt (10 ng/ml), um die Wirkung des IL-4 aufzuheben und somit nachzuweisen, dass die Wirkung durch dieses Zytokin hervorgerufen wurde. In einem weiteren Well wurde ein Isotypkontroll-Antikörper (10 ng/ml) (Kap. 2.1.2) zu dem IL-4 hinzugegeben, um eine unspezifische Wirkung des Antikörpers auszuschließen. Die CD4⁺ T-Zellen wurden für den Versuchsblock I (Kap. 2.5.1) 1 bis 3 Tage bei 37°C inkubiert. Bei den Versuchsblöcken II, III und IV (Kap. 2.5.2 bis 2.5.4) erfolgte eine Inkubation über 2 Tage.

2.3.6 Verarbeitung der Überstände und Herstellung von Zelllysaten

Die Bestimmung der Antigenkonzentration erfolgte mittels Sandwich-ELISA in den Überständen der Zellkulturen und in den Zelllysaten. Zur Gewinnung der Überstände wurden die Zellen abzentrifugiert (400 g, 10 min), der Überstand über dem Zellpellet anschließend vorsichtig abpipettiert und für spätere Messungen bei -20°C eingefroren.

Resuspension des Zellpellets in 1 ml PBS und anschließende Zentrifugation (400 g, 10 min) schlossen sich an. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen mit 200 µl Lysepuffer (Kap. 2.2) auf dem Vortex vermischt. Die Lyse erfolgte 30 Minuten auf Eis. Nach der Zentrifugation (21.382 g, 5 Minuten) wurde das Zelllysate vorsichtig abpipettiert und bei -20°C bis zur Analyse eingefroren.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können verschiedene Zellen anhand ihrer Struktur, Größe, Oberflächeneigenschaften und intrazellulärer Zusammensetzung differenziert werden. Die Zellen werden einzeln in einem laminaren Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeführt, wobei das monochromatische Licht gebrochen wird. Das dadurch entstehende Streulicht wird von Photodetektoren erfasst. Es wird in das Vorwärtsstreulicht (FSC; forward scatter) und in das im 90°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) eingeteilt. Anhand dieses Streulichts können Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zelle bestimmt werden, was die Differenzierung verschiedener Zellpopulationen ermöglicht. Bei den weißen Blutzellen ist eine Unterscheidung in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten möglich.

Zusätzlich können mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen Bestandteile von Zellen sichtbar gemacht werden. Diese Färbung kann direkt über DNS-Farbstoffe und indirekt über fluoreszierende Antikörper erfolgen. Bei diesen Versuchen wurde die indirekte Färbung angewendet. Die Anwendung der Antikörper kann intra- sowie extrazellulär erfolgen.

Das verwendete Durchflusszytometer FACScalibur der Firma Becton-Dickinson (2.1.1) besitzt einen Argonlaser der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$. Als Farbstoffe kamen drei verschiedene Fluorochrome zur Anwendung (Tab. 2-1), die alle das Licht des Argonlasers absorbieren.

Fluorochrom	Molekularmasse	Absorptions- maximum	Emissions- maximum	Anregungs- wellenlänge
FITC	389	495 nm	519 nm	488 nm
PE	240.000	480 nm, 565 nm	578 nm	488 nm
PerCP	35.000	482 nm	678 nm	488 nm

Tab. 2-1: Fluorochrome

Markierung von intrazellulären Antigenen:

Die Markierung intrazellulärer Antigene bestand grundlegend aus drei Schritten: Fixierung der Zellen, Permeabilisierung der Zellmembran und Antikörperbindung. Nach dem Ernten der Zellen wurde das Medium abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS fixierte 1 ml Paraformaldehyd (Kap. 2.2) bei 10-minütiger

Inkubation im Kühlschrank die Zellen. Nach einmaligem Waschen und Zentrifugation bei 560 g über 10 Minuten wurde der Überstand dekantiert. Die Zugabe des Permeabilisierungspuffer (Kap. 2.2) schloss sich an, gefolgt von einer gekühlten Inkubation über 10 Minuten. Nach Zentrifugation bei 400 g über 5 Minuten konnten die die Zellen in 200 µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert und anschließend auf die Röhren zur FACS-Messung zu jeweils 20 µl aufgeteilt werden. Die Zugabe der Antikörper erfolgte in dem ersten Versuchsblock (Kap. 2.5.1) wie in Tabelle 2-2 dargestellt.

Ansatz	FITC-konjugierter Antikörper	PE-konjugierter Antikörper	PerCP-konjugierter Antikörper
1	Anti - CD 4	Anti - CD 25	Anti - CD 3
2	-	Anti- IgG	-
3	-	Anti- Granzym A	-
4	-	Anti - Granzym B	-
5	-	Anti - Granzym K	-

Tab. 2-2: Ansätze für die durchflusszytometrische Messung

In den Versuchblöcken II und III (Kap. 2.5.2 und 2.5.3) wurden nur die Ansätze 1, 2 und 4 beibehalten. Die Proben wurden nach Zugabe der Antikörper kurz zentrifugiert und auf dem Vortex vermischt. Die anschließende Inkubation erfolgte über 20 Minuten, im Dunkeln und bei Raumtemperatur. Die ungebundenen Antikörper wurden durch Waschen mit 200 µl Waschpuffer (Kap. 2.2) entfernt. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, so dass das Zellpellet in einem Restüberstand von 50 µl verblieb. Nach Zugabe von 200 µl PBS konnten die Ansätze mit dem Durchflusszytometer gemessen werden.

Analyse und Auswertung:

Der erste Ansatz enthielt CD4⁺ T-Zell-spezifische Antikörper sowie einen Antikörper gegen den Aktivierungsmarker CD25. Dies definierte erneut die isolierte Zellpopulation und zeigte deren Aktivierungsstatus. Der zweite Ansatz stellte einen Kontrollansatz dar. Der Antikörper entspricht dem gleichen Isotyp, dem die antigenspezifischen Antikörper angehören, ohne ein spezifisches Antigen auf humanen Zellen zu binden. Er zeigt die unspezifische Bindung dieses Antikörperisotyps an. Die Ansätze drei bis fünf enthielten

Antikörper, die verschiedene zytotoxische Enzyme Granzym A, B und K spezifisch binden. Dadurch konnte quantitativ und qualitativ die Enzympräsenz bestimmt werden. Die Proben wurden nacheinander dem Durchflusszytometer zugeführt und anschließend analysiert. Im FSC/SSC-Diagramm wurde zunächst ein Gate um die Lymphozytenwolke bei typischer Granularität und Größe gelegt, um Zelltrümmer von der Analyse auszuschließen. Anschließend erfolgten die Bestimmungen der medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) der gegen die unterschiedlichen Enzyme gerichteten fluoreszierenden Antikörper in Histogramm-Plots (Abb. 2-3).

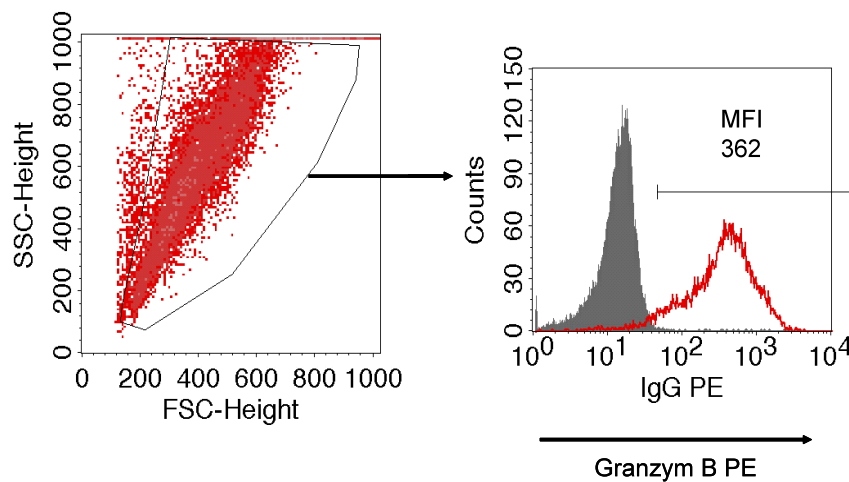


Abb. 2-3: Durchflusszytometrische Bestimmung von Enzymen in T-Zellen. Dargestellt sind im linken Diagramm alle gemessenen Zellen anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC). Das um die Zellen gelegte Gate verhindert das Messen in Zelldetritus, welcher sich wegen seiner geringeren Größe links neben der Hauptwolke darstellt. Das rechte Histogramm zeigt die Expression von Granzym B (rote Linie) im Vergleich zu einer entsprechenden Isotypkontrolle (grau). Angegeben wird darüber hinaus der Median der Fluoreszenzintensitäten von Granzym B (MFI 362) in den Granzym-B-positiven Zellen eines repräsentativen Probanden.

2.4.2 Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Die Granzym- und Zytokin-ELISA basieren auf dem Sandwich-Prinzip. Ein Antigen-spezifischer Antikörper wird dabei an eine feste Oberfläche adsorbiert. Das passende Antigen wird auf die fixierten Antikörper gegeben und bindet an diese. Mittels eines zweiten anschließend hinzugefügten Antigen-spezifischen, Biotin-markierten Antikörpers wird das gebundene Antigen detektiert. Das Biotin dient als Bindestelle für das Enzym, genauer für das Streptavidin des Enzym-Konjugats. Als Enzym kam die Streptavidin-Poly-Myeloperoxidase (Kap. 2.2) zur Anwendung. Aufgrund der Bindung mehrerer Biotin-Moleküle an einen Antikörper konnte die Sensitivität mit diesem Detektionssystem erhöht werden.

Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase diente TMB (Tetramethylbenzidin) (Kap. 2.2) zusammen mit H_2O_2 . Es wurde die Konzentration von Granzym B in den Überständen und Lysaten sowie die Konzentrationen von IL-4, IL-10 und IFN- γ in den Überständen und Perforin in den Lysaten gemessen. Alle Proben wurden doppelt bestimmt und die Ergebnisse gemittelt.

Die 96-Well-Mikrotiterplatten mit hoher Bindungskapazität wurden für 16 Stunden mit dem Fängerantikörper (100 μ l/Kavität) (Kap. 2.1.3) in Bindungspuffer (Kap. 2.2) (1:100 verdünnt) bei 4°C beschichtet. Nach 5-fachem Waschen mit PBS sättigte der Blockpuffer (Kap. 2.2) (200 μ l/Well) innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur die freien Proteinbindungsstellen ab. Weitere fünf Waschvorgänge mit Waschpuffer (Kap. 2.2) schlossen sich an. Anschließend erfolgte das Auftragen der Standards und Proben. Die Proben wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (1:5, 1:10 und 1:100) angesetzt, die Verdünnung erfolgte mit HPE-Puffer. Nach Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln befreite fünffaches Waschen die Kavitäten von freien Antigenen. Für die Detektor-Antikörper-Lösung wurden 100 μ l des biotinylierten Detektorantikörpers 1:100 in Puffer 2 (Kap. 2.2) verdünnt. Der Puffer 2 enthielt je 1 % Maus- und Rinderserum um unspezifische Bindungen des Detektorantikörpers zu minimieren. Die Detektor-Antikörper-Lösung konnte nun auf die fixierten Antigene aufgetragen werden. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln wurden die Kavitäten erneut 5-mal gewaschen. Das Enzym (Streptavidin-Poly-HRP-Konjugat) (1:5000 in Puffer 1, Endkonzentration 200 ng/ml, 100 μ l/Kavität) wurde aufgetragen und über 20 Minuten inkubiert. Nach fünffachem Waschen erfolgte die Zugabe des Substrats (Tetramethylbenzidin) in Citratpuffer (Lösung C, Kap. 2.2), welches innerhalb von 10 bis 30 Minuten im Dunkeln eine Farbreaktion zeigte. Bei abgestufter Verfärbung der Standardlösungen von hell nach dunkel wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung (Kap. 2.2) je Kavität unterbrochen. Die Lösungen in den Kavitäten verfärbten sich daraufhin gelb. Die Ansätze konnten jetzt im ELISA-Reader (Kap. 2.1.1) analysiert werden. Gemessen wurde die Absorption bei 450 nm und 620 nm als Referenz. Die Berechnung der Eichkurven erfolgte anhand der Standardlösungen und die Antigenkonzentration wurde mit der Software KC Junior analysiert. Die Versuchsparameter sind in Tabelle 2-3 gelistet.

Zur Bestimmung der Perforin-Konzentration in den Zelllysaten wurde ein kommerzielles ELISA-Kit entsprechend der Gebrauchsanleitung verwendet.

	Granzym B	IL-4	IL-10	IFN-γ	Perforin
Fängerantikörper, Klon	GB 11	Nicht bekannt, da kommerzielles ELISA-Kit			
Fängerantikörper, Endkonzentration [µg/ml]	2,0				
Detektionsantikörper, Klon	GB10				
Detektionsantikörper, Endkonzentration [µg/ml]	1,0				
Streptavidin-Poly-HRP-Konjugat, Endkonzentration [ng/ml]	200,0				
Standard	YT-Indy-Lysat	Rekombinante Standards			

Tab. 2-3: Versuchsparmeter der Granzym- und Zytokin-ELISA.

2.4.3 Zytotoxizitätsassays

Die zytotoxische Wirkung von Zellen kann mithilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Die Zellen mit zytotoxischem Potential, hier Effektorzellen genannt, werden mit einer weiteren Zellpopulation, den Zielzellen, zusammen kultiviert. Die Zielzellen werden vorher mit einer fluoreszierenden Substanz markiert, so dass die Zellpopulationen im Durchflusszytometer voneinander unterschieden werden können. Die hierfür verwendete Substanz CFSE (Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester) (Kap. 2.1.2) diffundiert in das Zellinnere. Sie ist zunächst farblos und wird erst durch intrazelluläre Esterasen zu dem fluoreszierenden Carboxyfluoreszein-Succinimidylester umgewandelt. Dieses bindet kovalent an zelleigene Amine. Während der Inkubation der beiden Zellpopulationen töten die Effektorzellen entsprechend ihres zytotoxischen Potentials die Zielzellen. Die Differenzierung zwischen toten und lebendigen Zellen erfolgt im Durchflusszytometer mithilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffs 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (Kap. 2.1.2). Der Farbstoff lässt sich mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm anregen und hat ein Emissionsmaximum von 647 nm. Er kann jedoch nur durch die Zellmembran toter Zellen diffundieren und interkaliert dort zwischen den Basen Cytosin und Guanin der DNA.

Als Zielzellen wurden K562 Zellen (Kap. 2.1.2) verwendet und mit PBS (+ 0,1 % BSA) auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt. Je 2,5 μl CFSE-Stammlösung (5 mM) wurden zu 997,5 μl der K562-Zellsuspension gegeben und vermisch (Endkonzentration: 125 nM) und daraufhin über 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend stoppte die Zugabe

von 10 ml eiskaltem Medium 2 (Kap. 2.2) die Reaktion. 3-maliges Waschen mit Medium 2 entfernte freies CFSE.

Die Effektorzellen wurden nach der in Kapitel 2.3.5 beschriebenen Kultivierung ebenfalls geerntet. Die K562 Zellen ($2 \times 10^5/\text{ml}$) wurden gemeinsam mit den Effektorzellen ($2 \times 10^6/\text{ml}$) unter Zugabe von Interleukin-2 (100 U/ml) (Kap. 2.1.2) in Kultur gebracht. Das Verhältnis zwischen Effektor- und Zielzellen lag demnach bei 10:1. In weiteren Ansätzen wurden den Zellen Inhibitoren hinzugefügt. Dies war zum Einen z-AAD-cmk (50 μM), ein spezifischer Granzym-B-Inhibitor. Er bindet das aktive Zentrum des Enzyms und verhindert dadurch dessen Wirkung. Der zweite verwendete Inhibitor war EGTA (4 mM). Dies ist kein spezifischer Inhibitor des Granzym B. Es bindet kovalente Kationen, welche für den Granula-Exozytose-Apoptoseweg essentiell sind. Es inhibiert die Kalzium-abhängige Polymerisation des Perforin und liefert dadurch Hinweise bezüglich der Abhängigkeit der Apoptose von Perforin. Die Inhibitoren verhindern oder reduzieren die Mechanismen der Zelltötung. Mittels dieser kann die Bedeutung von Granzym B und Perforin von dem Granula-Exozytose-Apoptoseweg analysiert werden. Die Ansätze wurden über 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Detektion der toten Zellen wurde den Ansätzen 10 μl 7-AAD-Lösung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte anschließend über 20 Minuten im Dunkeln. Freies 7-AAD konnte durch Waschen mit 500 μl Waschpuffer (Kap. 2.2) entfernt werden. Die Zellen wurden in 200 μl PBS resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer wie beschrieben analysiert (Grossman et al. 2004 B).

2.5 Aufbau der Versuche

2.5.1 Versuchsblock I: Einfluss verschiedener Stimulationsprotokolle auf die Granzym-Synthese in CD4⁺ T-Zellen

In der ersten Versuchsphase sollte die Synthese zytotoxischer Enzyme in adaptiven regulatorischen CD4⁺ Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden CD4⁺ Zellen isoliert (Kap. 2.3.1 - 2.3.4) und unterschiedlich stimuliert (Kap. 2.3.5), um so die Differenzierung zu zwei unterschiedlichen Zellpopulationen zu induzieren, den adaptiven regulatorischen (IL-2/anti-CD3/anti-CD46) sowie den regulär aktivierten (IL-2/anti-CD3/anti-CD28) CD4⁺ Zellen. Über einen Inkubationsverlauf von 1 bis 3 Tagen wurde täglich die Expression der Enzyme Granzym A, B und K im Durchflusszytometer bestimmt.

2.5.2 Versuchsblock II: Einfluss von IL-4 auf die Synthese zytotoxischer Enzyme in adaptiven regulatorischen CD4⁺ T-Zellen

In der zweiten Versuchsphase wurden CD4⁺ Zellen isoliert (Kap. 2.3.1 - 2.4). Anschließend wurden die Zellen zwei Tage kultiviert, wobei die Differenzierung zu adaptiven regulatorischen T-Zellen induziert wurde (Kap. 2.3.5). Einigen Versuchsansätzen wurde Interleukin-4 in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 – 100 ng/ml) hinzugegeben. Ein weiterer Ansatz enthielt zusätzlich zu IL-4 einen gegen IL-4 gerichteten Antikörper, ein weiterer IL-4 sowie einen Kontrollantikörper. Der Kontrollantikörper besitzt den gleichen Isotyp wie der gegen IL-4 gerichtete Antikörper. So kann nachgewiesen werden, dass die Wirkung allein durch den aktiven F_{ab}-Teil des Antikörpers und nicht durch andere Strukturen ausgelöst wird. Die Produktion zytotoxischer Enzyme wurde nach 2-tägiger Inkubation mittels Durchflusszytometer in den Zellen und mittels Sandwich-ELISA in Kulturüberständen und Zelllysaten gemessen.

2.5.3 Versuchsblock III: Einfluss von IL-4 auf das zytotoxische Potential adaptiver regulatorischer CD4⁺ T-Zellen

Die CD4⁺ T-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.5.2 isoliert, für zwei Tage kultiviert und zu adaptiven T_{regs} ausdifferenziert. Die Induktion der adaptiven T_{regs} fand ohne bzw. in Gegenwart von 100 ng/ml IL-4 statt. Die regulatorischen T-Zellen wurden gemeinsam mit den K562 Zielzellen über 4 Stunden inkubiert. Darüber hinaus erfolgte in einigen Ansätzen die Zugabe der Inhibitoren EGTA oder z-AAD-cmk. Diese reduzieren die Wirkung des Enzyms und können so, wenn die Zytotoxizität unter den Inhibitoren abfällt, bestätigen, dass der zytotoxische Effekt auf dem Granzym B bzw. Perforin beruht (s. 2.4.3). Anschließend wurden die Apoptoseraten mittels Durchflusszytometer bestimmt und die Ansätze mit und ohne Zugabe von IL-4 sowie mit und ohne Zugabe der Granzym-B-Inhibitoren miteinander verglichen.

2.5.4 Versuchsblock IV: Einfluss von IL-4 auf die Sekretion von IL-10 und IFN- γ durch adaptive regulatorische CD4⁺ T-Zellen

Die CD4⁺ T-Zellen wurden wie in Kapitel 2.5.2 isoliert und über 2 Tage kultiviert und zu adaptiven T_{regs} ausdifferenziert. Einigen Versuchsansätzen wurde Interleukin-4 in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 – 100 ng/ml) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Bestimmung und der Vergleich der IL-10- und IFN- γ -Konzentrationen in den Kulturüberständen mittels ELISA.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Granzym A, B und K in adaptiven regulatorischen und regulär aktivierten CD4⁺ Zellen

Adaptive regulatorische T-Zellen (induziert mittels IL-2, anti-CD3 und anti-CD46) und regulär aktivierte CD4⁺ Zellen (IL-2, anti-CD3, anti-CD28) exprimieren zytotoxische Enzyme. Laut einer früheren Studie (Grossman et al. 2004) exprimieren regulatorische T-Zellen (T_{regs}) sogar mehr dieser Enzyme, insbesondere Granzym B, als regulär aktivierte T-Zellen. Die in der oben genannten Studie beschriebenen Versuche wurden wiederholt, um den Beweis auch unter hiesigen Laborbedingungen zu erbringen. Die Tatsache, dass die T_{regs} zytotoxische Enzyme exprimieren, stellt die Grundlage der weiteren Versuche dar.

CD4⁺ Zellen wurden aus dem Vollblut isoliert und anschließend die Entwicklung zu den zwei oben genannten CD4⁺ T-Zellpopulationen induziert. Nach 1- bis 3-tägiger Inkubation wurde täglich die Produktion der zytotoxischen Enzyme Granzym A, B und K im Durchflusszytometer evaluiert. Die Expressionsintensität der Enzyme in beiden CD4⁺ T-Zellpopulationen wurde anschließend miteinander verglichen. Neben den beiden aktivierten Zellpopulationen wurden CD4⁺ Zellen ebenfalls unter alleiniger Zugabe von IL-2 kultiviert. So wurden sie in der naiven Form belassen, ohne sich durch die Zugabe von Antikörpern zu einem der aktivierten Subtypen zu entwickeln. Somit konnte die Basisenzymproduktion der CD4⁺ Zellen bestimmt und zu Vergleichen herangezogen werden.

Zunächst wurde der Aktivierungszustand der Zellen evaluiert. Hierzu diente unter anderem die Bestimmung der Zellgranularität. Die von den Zellen synthetisierten zytotoxischen Enzyme werden zunächst in Granula im Zytosol gespeichert. Wenn die Zelle zur Enzymsekretion stimuliert wird, kann sie die gespeicherten Enzyme sofort freisetzen. Es entsteht kein Zeitverlust durch die Enzymsynthese. Je mehr Enzyme in einer Zelle synthetisiert und gespeichert werden, desto höher ist ihre Granularität, welche im Durchflusszytometer anhand des *sideward scatter* (SSC) dargestellt werden kann.

Die durchflusszytometrischen Messungen zeigten bei beiden durch Antikörper aktivierten Zellpopulationen Zellen höherer Granularität, welche im Verlauf von drei Tagen zunahm (Abb. 3-1).

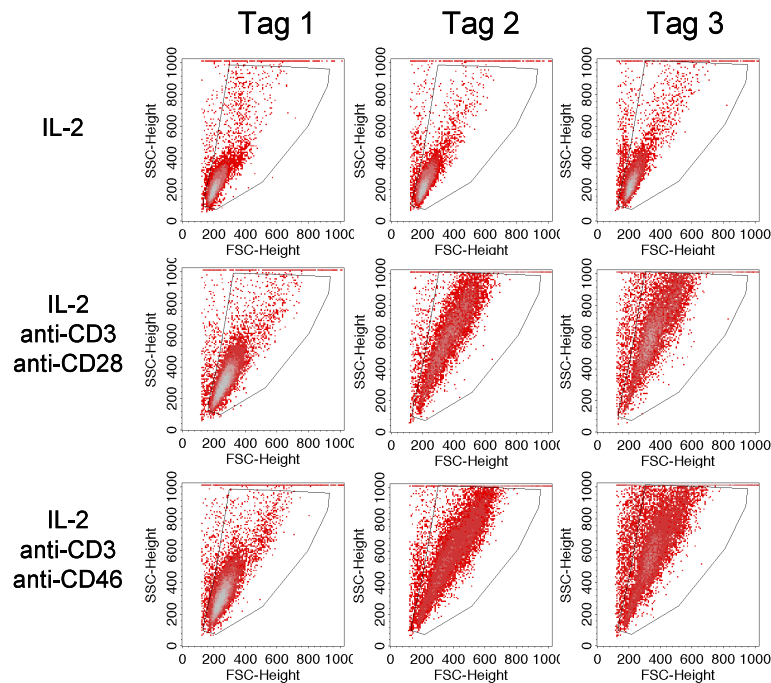


Abb. 3-1: Größe und Granularität unterschiedlich stimulierter $CD4^+$ T-Zellen. Die Dot-Plots zeigen die Größe (FSC) und Granularität (SSC) unterschiedlich stimulierter $CD4^+$ T-Zellen. Dargestellt sind die Messungen eines repräsentativen Probanden an drei aufeinander folgenden Tagen.

Ein weiteres Maß zur Bestimmung des Aktivierungszustandes dieser Zellen ist die Präsenz des Oberflächenmoleküls CD25. Dieser Marker ist ein Bestandteil des IL-2-Rezeptors und wird im aktivierten Zustand von Zellen (T- und B-Lymphozyten) auf deren Oberfläche exprimiert. Der aktivierte Zustand zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellen vermehrt Enzyme produzieren und sich teilen. Mit Hilfe eines fluoreszierenden, gegen CD25 gerichteten Antikörpers konnte die Expression von CD25 überprüft und somit der Aktivierungszustand der Zellen beurteilt werden (Abb. 3-2). Die Wolke der Zellen, die sowohl $CD4^+$ als auch $CD25^+$ waren, zeigt sich im rechten oberen Quadranten der Grafiken. Bei den Zellen, die durch die alleinige Zugabe von IL-2 stimuliert wurden, konnte keine signifikante Zunahme der Expression dieses Oberflächenmoleküls gemessen werden. Sie sind größtenteils im linken oberen

Quadranten lokalisiert und somit als CD4-positive aber CD25-negative Zellen einzuordnen.

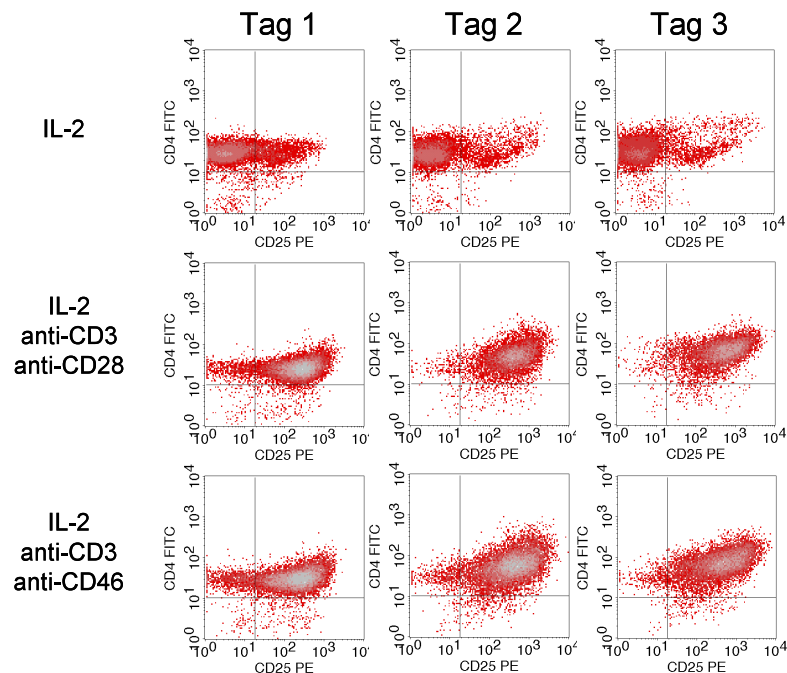
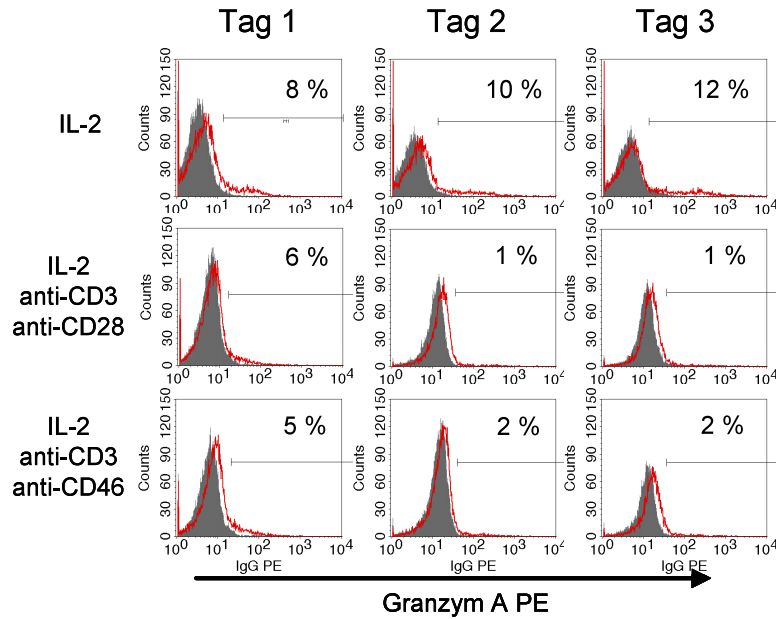


Abb. 3-2: Expression von CD25 auf unterschiedlich stimulierten CD4⁺ T-Zellen. Angegeben ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD25 als Zeichen der Aktivität in regulär aktivierten (IL-2, CD3, CD28) und adaptiven regulatorischen (IL-2, CD3, CD46) CD4⁺ Zellen sowie in CD4⁺ Zellen unter alleiniger IL-2-Zugabe. Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen.

Nachdem bei beiden Zellreihen erhöhte Granularität sowie die Expression von CD25 festgestellt werden konnte, wurden die zytotoxischen Enzyme Granzym A, B und K in den Zellen bestimmt.

Die Messung des Granzym A zeigte weder bei den regulär aktivierten noch bei den adaptiven regulatorischen Zellen eine erhöhte Expression. In Abbildung 3-3 ist der Anteil der Granzym-A-positiven Zellen in Prozent dargestellt. Die höchsten Werte konnten bei den CD4⁺ Zellen festgestellt werden, die lediglich mit IL-2 stimuliert wurden. Hierbei zeigten 8% (Tag 1), 10% (Tag 2) bzw. 12% (Tag 3) der Zellen eine Granzym-A-Expression. Bei den beiden aktivierten CD4⁺ T-Zellpopulationen zeigten sich am ersten Tag jeweils die höchsten Werte mit 6 bzw. 5% (T_{regs}), welche an den darauf folgenden Tagen auf 1 bzw. 2% (T_{regs}) abfielen. Es ließ sich demnach keine Steigerung einer Granzym-A-Synthese weder durch die Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mittels anti-CD3/anti-CD28 noch mittels anti-CD3/anti-CD46 induzieren.

Abb. 3-3: Granzym-A-Synthese in unterschiedlich stimulierten CD4⁺ T-Zellen. Die Histogramme zeigen die Expression von Granzym A (rote Linie) im Vergleich zu einer entsprechenden Isotypkontrolle (grau). Dargestellt ist die Granzym-A-Expression an drei aufeinander folgenden Tagen eines repräsentativen Probanden.



Im Gegensatz zum Granzym A konnten bei der Bestimmung von Granzym B deutlich erhöhte Werte sowohl bei den regulär aktivierten als auch bei den adaptiven regulatorischen T-Zellen festgestellt werden. Die Granzym-B-Synthese war an Tag 2 und 3 in nahezu 100% der Zellen nachweisbar, so dass in den entsprechenden Diagrammen anstelle der prozentualen Werte die medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) angegeben sind. Dadurch kann die Menge der gebundenen fluoreszierenden Antikörper evaluiert werden, so dass als Rückschluss die Quantität der Enzymsynthese abgeschätzt werden kann. Der höchste Anstieg der Granzym-B-Expression war mit einer MFI von 362 am zweiten Tag bei den T_{regs} nachzuweisen. Auch bei den regulär aktivierten Zellen zeigten sich deutlich erhöhte Werte des Granzym, welche jedoch mit einer MFI von 138 weniger als die Hälfte der Fluoreszenzintensität der T_{regs} erreichte (Abb. 3-4). Die Menge der CD4⁺ Zellen nach alleiniger IL-2-Stimulation, in denen eine Granzym-B-Synthese festzustellen war, zeigte sich vernachlässigbar gering mit 1% (Tag 1), 2% (Tag 2) und 6% (Tag 3) der Gesamtzellzahl.

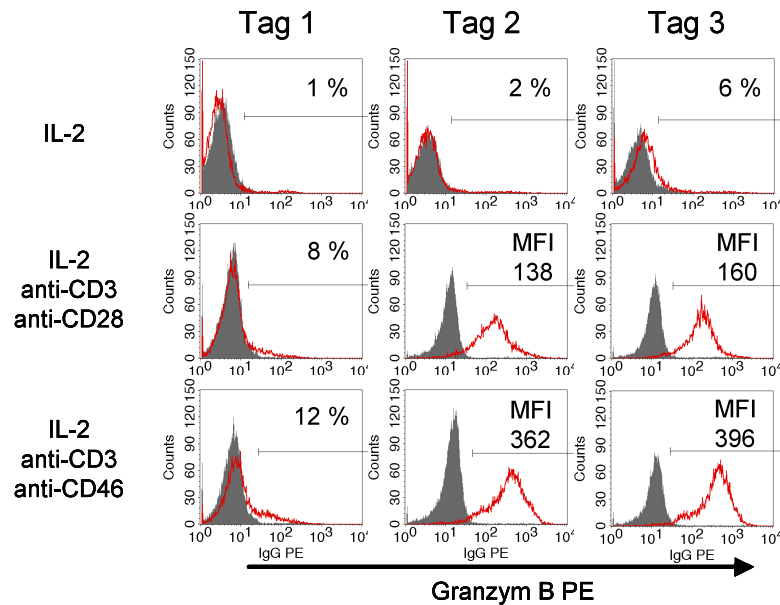
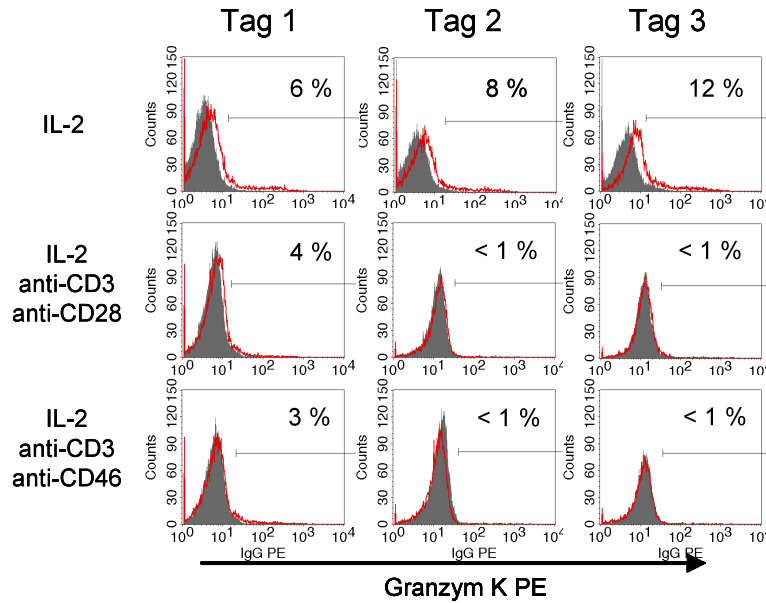


Abb. 3-4: Granzym-B-Synthese in unterschiedlich stimulierten $CD4^+$ T-Zellen. Die Histogramme zeigen die Expression von Granzym B (rote Linie) im Vergleich zu einer entsprechenden Isotypkontrolle (grau). Dargestellt ist die Granzym-B-Expression an drei aufeinander folgenden Tagen eines repräsentativen Probanden.

Anhand dieser Grafik ist bereits zu erkennen, dass die MFI-Werte von dem ersten auf den zweiten Tag sowie von dem zweiten auf den dritten Tag anstiegen. Die Konzentration des Enzyms nahm somit von Tag zu Tag zu. Am dritten Tag zeigte sich ein Farbumschlag des Mediums, in dem die Zellen kultiviert wurden, was dafür spricht, dass die Inhaltsstoffe des Mediums verbraucht waren. Für weitere Versuche sollten die Enzymkonzentrationen auch in den Zellüberständen, also dem Medium, gemessen werden. Aus diesem Grund wurde für die Versuchblöcke II, III und IV eine Inkubationszeit von zwei Tagen ausgewählt, so dass die Nährstoffe des Mediums noch nicht aufgebraucht waren, die Differenz der Granzym-B-Expression zwischen adaptiven regulatorischen und regulär aktivierten $CD4^+$ Zellen jedoch schon deutlich messbar war. Im Gegensatz zu den deutlichen Anstiegen von Granzym B zeigten die durchflusszytometrischen Messungen von Granzym K analog zu Granzym A keine nennenswert erhöhte Expression. Auch bei diesem Enzym lagen die Werte bei den Zellen, die allein durch IL-2 stimuliert wurden, am höchsten (Abb. 3-5).

Abb. 3-5: Granzym-K-Synthese in unterschiedlich stimulierten $CD4^+$ T-Zellen. Die Histogramme zeigen die Expression von Granzym K (rote Linie) im Vergleich zu einer entsprechenden Isotypkontrolle (grau). Dargestellt ist die Granzym-K-Expression an drei aufeinander folgenden Tagen eines repräsentativen Probanden.



3.2 Einfluss von Interleukin-4 auf die Expression von Granzym B in adaptiven regulatorischen CD4⁺ Zellen

Nach dem Nachweis einer erhöhten Expression von Granzym B in adaptiven regulatorischen CD4⁺ Zellen wurde untersucht, ob das Zytokin Interleukin-4 Einfluss auf die Expression dieses Enzyms nimmt. Hierfür wurden mittels der Dichtegradientenzentrifugation und automatischer magnetischer Zellsortierung CD4⁺ Zellen isoliert und anschließend zu adaptiven regulatorischen Zellen induziert (Kap. 2.3.1-2.3.5). Den Zellen wurde, als sie nach der Isolierung in Kultur gebracht worden sind, Interleukin-4 unterschiedlicher Konzentrationen hinzugegeben und mit Ansätzen ohne Zugabe von Interleukin-4 verglichen. So konnte die Wirkung von Interleukin-4 auf die Expression von Granzym B analysiert werden. Die Zellen in den unterschiedlichen Ansätzen wurden über 2 Tage inkubiert, da in dem Versuchsblock I (Kap. 2.5.1) deutlich wurde, dass eine 2-tägige Inkubation die besten Versuchs- und Auswertbedingungen bot (Kap. 3.1). Die Ergebnisse wurden mittels Durchflusszytometrie und ELISA bestimmt.

In Abbildung 3-6 ist die mittels Durchflusszytometer ermittelte, konzentrationsabhängige Abnahme des Granzym B unter IL-4 anhand eines Probanden dargestellt.

Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) wurde unter Zugabe von maximal 100 ng/ml IL-4 von 181 auf bis zu 62 reduziert.

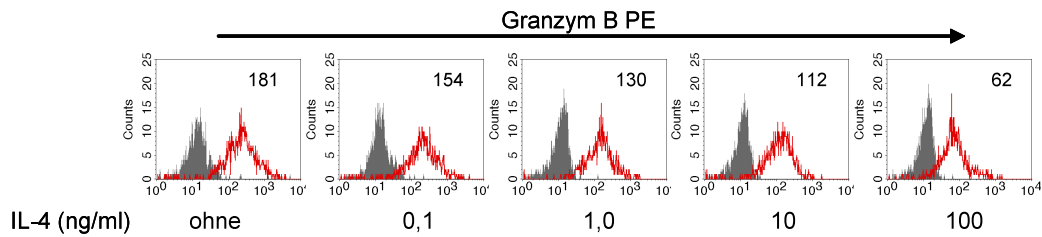


Abb. 3-6: Granzym-B-Produktion unter dem Einfluss von Interleukin-4 eines Probanden im Durchfluss-zytometer. Gezeigt werden die medianen Fluoreszenzintensitäten von Granzym B unter dem Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationen des Interleukins-4 bei einem Probanden.

Bei den durchflusszytometrischen Messungen zeigten sich zu geringe Unterschiede der medianen Fluoreszenzintensitäten bei den unterschiedlichen IL-4-Konzentrationen, um signifikante Ergebnisse zu erzielen. Aus diesem Grund wurde das Verfahren mittels ELISA bevorzugt und für die weiteren Versuche verwendet.

Hierbei stellte sich heraus, dass Interleukin-4 einen hemmenden Effekt auf die Granzym-B-Synthese hat. Auffällig war, dass bei der Hälfte der Probanden, hier Responder genannt, der Effekt des Interleukin-4 auf die Granzym-B-Synthese deutlicher hervorkam und die Werte der Granzym-B-Konzentration negativ mit den hinzu gegebenen IL-4-Konzentrationen korrelierten. In den durchflusszytometrischen Messungen konnte ein strikt konzentrationsabhängiger Abfall der Granzym-B-Expression unter Zugabe von IL-4 (0,1-100 ng/ml) nachgewiesen werden (Abb. 3-7), welcher bei der anderen Hälfte der Probanden, hier Nonresponder genannten, nicht vorlag.

In den ELISA-Messungen, bei denen die Enzymkonzentrationen sowohl in Zelllysaten als auch in den Zellüberständen bestimmt wurden, zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Auch hier konnte bei etwa der Hälfte der Probanden eine konzentrationsabhängige Hemmung der Granzym-B-Synthese durch IL-4 festgestellt werden. Bei den Zelllysaten war durchschnittlich eine Reduktion der messbaren GrB-Konzentrationen auf bis zu 60% des Ausgangswertes nachweisbar. In den Überständen sank die Enzym-Konzentration maximal auf 75% ab. Unter Zugabe der geringsten Dosis von IL-4 (0,1 ng/ml) wurde der Ausgangswert des Granzym B nur gering reduziert. Der Wert sank bei steigender Konzentration des Zytokins weiter ab und erreichte bei der

maximalen IL-4-Konzentration von 100 ng/ml sein Minimum (Abb. 3-7 und 3-8). Bei den Respondern konnte somit eine suppressive Wirkung des IL-4 auf die Granzym-B-Produktion nachgewiesen werden.

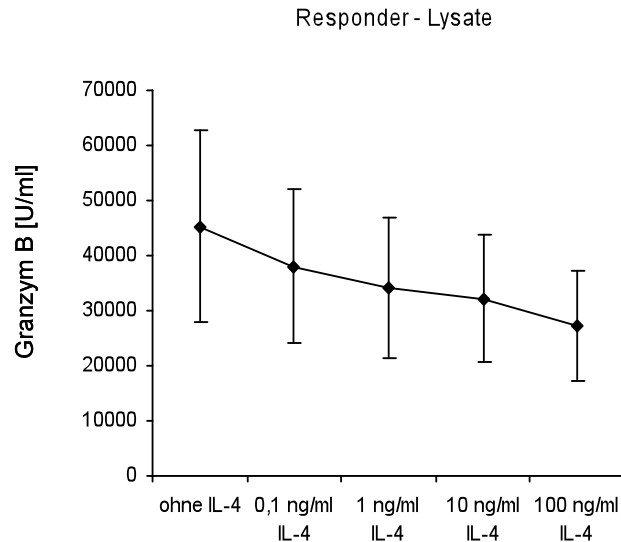


Abb. 3-7: Granzym-B-Expression der T_{regs} unter dem Einfluss von Interleukin-4 in Zelllysaten bei Respondern. Angegeben sind die mittels ELISA verifizierte Mengen von Granzym B sowie die Standardabweichungen am Tag 2 unter dem Einfluss der verschiedenen IL-4-Konzentrationen.

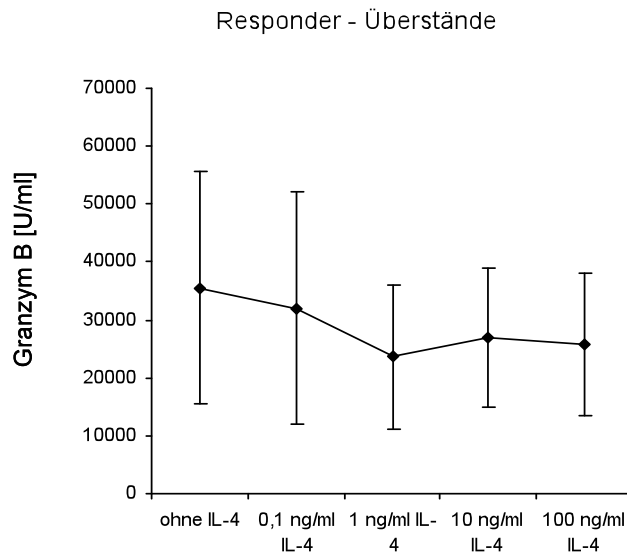


Abb. 3-8: Granzym-B-Sekretion der T_{regs} unter dem Einfluss von Interleukin-4 in den Zellüberständen bei Respondern. Angegeben sind die mittels ELISA verifizierte Menge von Granzym B sowie die Standardabweichungen am Tag 2 unter dem Einfluss der verschiedenen IL-4-Konzentrationen.

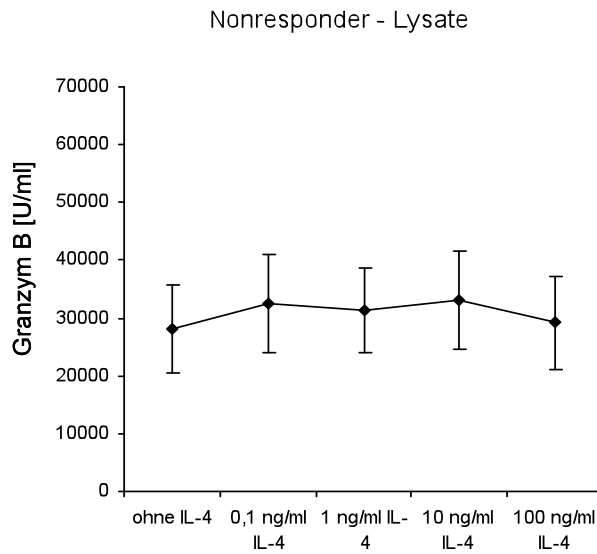


Abb. 3-9: Granzym-B-Synthese in den Zelllysaten bei Nonrespondern. Dargestellt sind die mittels ELISA gemessenen Werte des Granzym B in Zelllysaten mit und ohne Zugabe von Interleukin-4 unterschiedlicher Konzentrationen.

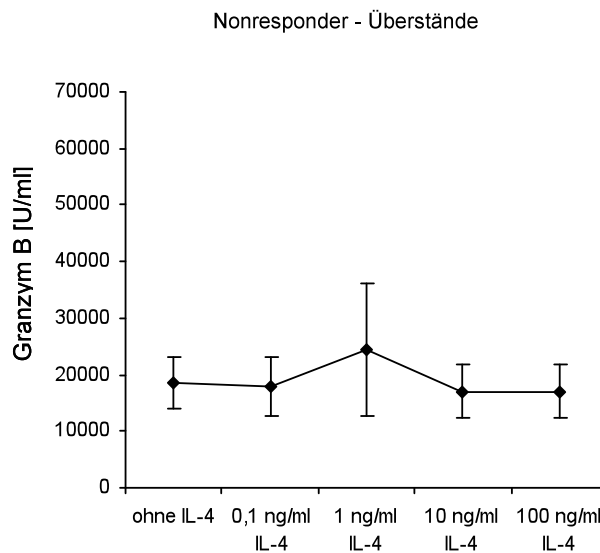


Abb. 3-10: Granzym-B-Synthese in den Zellüberständen bei Nonrespondern. Dargestellt sind die mittels ELISA gemessenen Werte des Granzym B in Zelllysaten mit und ohne Zugabe von Interleukin-4 unterschiedlicher Konzentrationen.

Im Gegensatz zu den Respondern zeigte sich bei den Nonrespondern kaum eine Änderung der Granzym-B-Expression unter der Zugabe von IL-4 (Abb. 3-9 und 3-10). Bei diesen Probanden waren jedoch auch ohne Zugabe von IL-4 schon sehr niedrige Konzentrationen von Granzym B feststellbar. Der Ausgangswert, also der Wert bei dem kein IL-4 hinzugegeben wurde, lag bei den Respondern im Mittel bei 45.000 U/ml. Der Wert der Nonresponder lag nur bei ca. 28.000 U/ml. Dieser Wert entspricht ziemlich genau dem Mittelwert der Granzym-B-Konzentration bei den Respondern unter dem Einfluss der höchsten IL-4-Konzentration (100 ng/ml). Daraufhin stellte sich der Verdacht, dass bei den Nonrespondern hohe Konzentrationen von intrinsischem, von den Probanden selbst synthetisierten, IL-4 vorliegen könnten. Wenn bei den Probanden bereits relativ hohe Konzentrationen des Zytokins vorliegen, ohne dass zusätzlich welches hinzugegeben wird, könnte schon der Ausgangswert unter der inhibierenden Wirkung des intrinsischen IL-4 niedrig sein. Daher wurde die Konzentrationen von IL-4 in den Überständen aller Probanden mittels ELISA bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bei den Nonrespondern intrinsische IL-4-Konzentrationen von durchschnittlich 472,4 pg/ml nachgewiesen werden konnten. Die Konzentrationen bei den Respondern lagen im Mittel bei 88,6 pg/ml (Abb. 3-11).

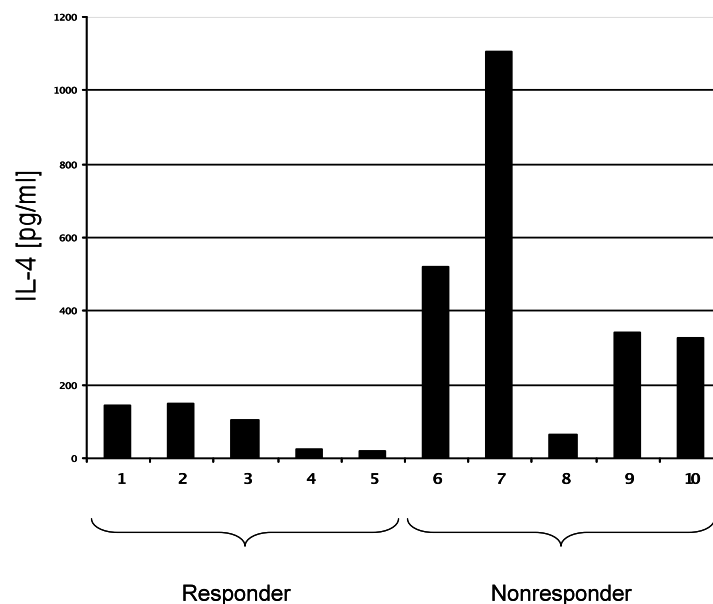


Abb. 3-11: Intrinsisches Interleukin-4 bei Respondern und Nonrespondern. Dargestellt sind die mittels ELISA bestimmten Konzentrationen von intrinsischem IL-4 in den Kulturüberständen nach Stimulation durch CD3/CD46 sowie Interleukin-2 (T_{regs}) der 10 Probanden.

Das mithilfe des ELISA ermittelte Ergebnis, dass IL-4 die Granzym-B-Synthese hemmt, konnte anhand der Durchflusszytometrie bestätigt werden. Hierbei wurden nur zwei Werte bestimmt: ohne IL-4-Zugabe und mit der höchsten Konzentration (100 ng/ml) des Zytokins. In der Abbildung 3-12 sind die Daten der einzelnen Probanden sowie die Mittelwerte der medianen Fluoreszenzintensitäten unter und ohne dem Einfluss von Interleukin-4 angegeben. Der Abfall der Granzym-B-MFIs ist deutlich erkennbar.

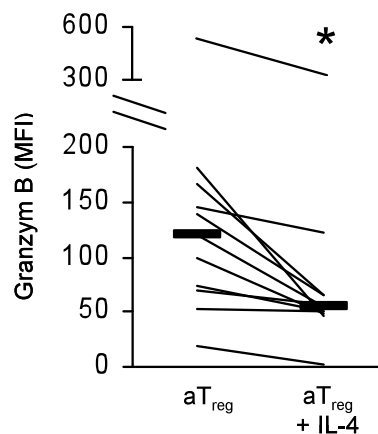


Abb. 3-12: Granzym-B-Synthese unter dem Einfluss von Interleukin-4. Angegeben sind die medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) von 10 Probanden ohne und unter dem Einfluss von IL-4. Die Balken stellen die Mittelwerte dar. Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde auf $P < 0.05$ festgelegt.

Um den Beweis zu erbringen, dass IL-4 an sich und nicht andere Mechanismen, die durch dessen Zugabe ausgelöst wurden, die Suppression von Granzym B verursacht, wurde einigen Ansätzen zusätzlich zu dem IL-4 ein gegen IL-4 gerichteter Antikörper gegeben. Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass die hemmende Wirkung des IL-4 durch den gegen das Zytokin gerichteten Antikörper aufgehoben wurde. Die Konzentrationen von Granzym B lagen häufig sogar über den Ausgangswerten (Abb. 3-13).

In einem weiteren Ansatz wurde zusätzlich zu dem IL-4 ein Kontrollantikörper hinzugegeben. Antikörper können auch mit Anteilen, die nicht der eigentlich aktiven F_{ab}-Region angehören, Reaktionen in Zellen auslösen. Um diese Wirkung auszuschließen wurde dem IL-4 ein Kontrollantikörper hinzugegeben, welcher die gleiche Grundstruktur wie der gegen IL-4 gerichtete Antikörper besitzt. Die beiden

Antikörper unterscheiden sich somit nur in der F_{ab}-Region, dem aktiven Zentrum der Antikörper, und haben somit, wenn überhaupt, die gleichen Nebeneffekte zur Folge.

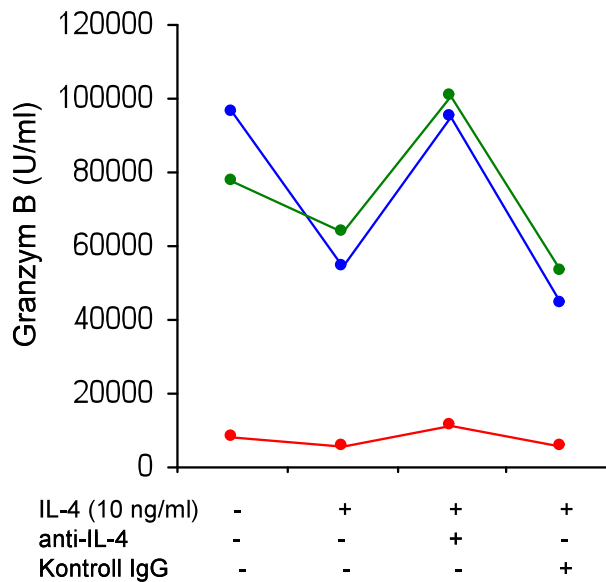


Abb. 3-13: Hemmung der Granzym-B-Synthese durch Interleukin-4. Dargestellt sind beispielhaft die mittels ELISA bestimmten Mengen von Granzym B dreier Probanden ohne und mit Zugabe von IL-4 sowie unter zusätzlicher Gabe von anti-IL-4 bzw. dem Kontrollantikörper.

3.3 Der Einfluss von IL-4 auf die Perforin-Expression in aT_{regs}

Zusätzlich zu der Wirkung von IL-4 auf Granzym B wurde dessen Wirkung auf die Produktion von Perforin bestimmt. Perforin gilt als Faktor, der die zytotoxische Wirkung von Granzym B unterstützt, indem es die Zellwände perforiert und dadurch dem zytotoxischen Enzym den Eintritt in die Zelle möglich macht. Dabei zeigte sich jedoch, dass das Zytokin keinen relevanten Einfluss auf die Synthese des Perforins nimmt (Abb. 3-14).

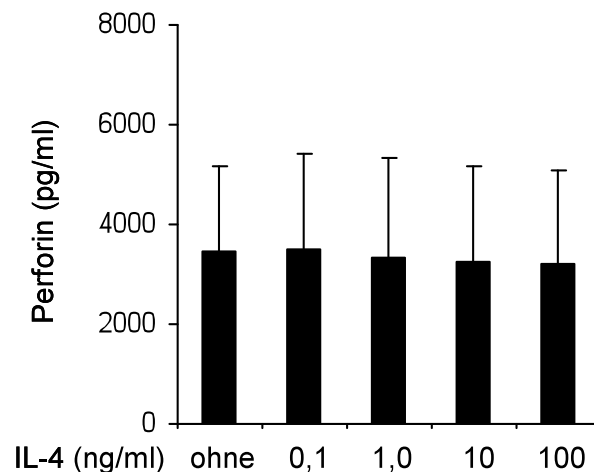


Abb. 3-14: Beeinflussung der Perforinsynthese unter Interleukin-4. Dargestellt sind die mittels ELISA gemessenen Werte von Perforin in Ansätzen ohne Interleukin-4 sowie unter Zugabe verschiedener Konzentrationen des Zytokins.

3.4 Einfluss von Interleukin-4 auf das zytotoxische Potential adaptiver regulatorischer CD4⁺ Zellen

Zytotoxische Enzyme bewirken über verschiedene Mechanismen eine Induktion der Apoptose in Zielzellen und lösen damit deren Tod aus. Das in dieser Arbeit analysierte Granzym B nutzt hierfür den Granzym-B/Perforin-spezifischen Auslösemechanismus (Kap. 1.3). Mit Hilfe eines Zytotoxizitätsassays kann der Einfluss von biologischen (z.B. Effektorzellpopulationen), chemischen (z.B. Zytostatika) oder auch physikalischen (z.B. UV-Strahlung) Reizen auf die Apoptoserate von bestimmten Zielzellen analysiert werden (Kap. 2.4.3). So wurden bei diesen Experimenten die Apoptoseraten von K562 Zellen in Co-Kultur sowie ohne Zugabe von adaptiven regulatorischen CD4⁺ Zellen bestimmt. Für diesen Versuch wurden T_{regs} von Respondern mit K562 Zellen als Zielzellen im Verhältnis 10:1 inkubiert. Nach einer 4-stündigen Inkubation wurde die Menge der toten Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Dafür wurde der Farbstoff 7-AAD als Marker für den Zelltod genutzt. Dieser durchdringt nur die Zellmembranen der toten Zellen (7-AAD-positive Zellen), so dass diese im Durchflusszytometer von den lebendigen (7-AAD-negative Zellen) differenziert werden können. Die Ergebnisse wurden mit Ansätzen ohne Zugabe von adaptiven T_{regs} verglichen. Unter der

Anwesenheit der adaptiven T_{regs} konnte ein signifikant erhöhter Anteil toter K562 Zellen detektiert werden (Abb. 3-15).

Um die Bedeutung von Granzym B für den Tod der K562 Zellen zu verifizieren, wurde z-AAD-cmk hinzugegeben und dessen Auswirkung auf die Todesrate analysiert. Z-AAD-cmk ist ein Granzym-B-spezifischer Inhibitor, der direkt das Enzym hemmt, indem er das aktive Zentrum blockiert. Es zeigte sich eine deutlich reduzierte Todesrate unter Zugabe des Inhibitors z-AAD-cmk. Desweiteren wurde die Wirkung von EGTA auf die Todesrate analysiert. EGTA ist ein Chelator und fängt divalente Kationen im Medium ab. Der Granula-Exozytose-Apoptoseweg ist abhängig von divalenten Kationen. Somit ist eine Hemmung des Zelltodes durch EGTA ein Hinweis auf die Beteiligung dieses Weges am Zelltod. Auch EGTA reduzierte die Wirkung des Granzym B. Der Effekt war etwas deutlicher sichtbar als bei z-AAD-cmk. Die Apoptoserate wurde unter EGTA von 49,4 % auf 19,1 % und unter z-AAD-cmk auf 26,9 % reduziert. Somit zeigte sich, dass die T_{regs} mittels eines Granula-Exozytose-Apoptosewegs zytotoxisch wirken, welcher wahrscheinlich durch das Granzym B ausgelöst wird.

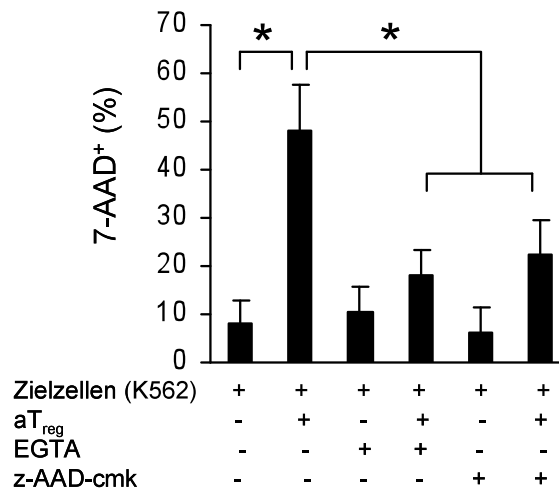


Abb. 3-15: aT_{regs} induzieren Granzym-B-abhängig den Zelltod von K562 Zellen. aT_{regs} und K562 Zellen wurden im Verhältnis 10:1 für vier Stunden co-inkubiert. Der Prozentsatz 7-AAD-positiver K562 Zellen dient als Maß für den Zelltod. Wie angegeben wurde einigen Versuchsansätzen EGTA (4 mM) bzw. der Granzym-B-Inhibitor z-AAD-cmk (50 µM) zugegeben. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von sieben unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels gepaartem t-Test ermittelt. *Das Signifikanzniveau wurde auf $P < 0,05$ festgelegt.

Ein weiterer Hinweis auf die Granzym-B-Abhängigkeit der Zytotoxizität ist der Zusammenhang zwischen der Menge des synthetisierten Enzyms und des induzierten Zelltodes. Abbildung 3-16 zeigt die enge Korrelation zwischen der Menge des produzierten Granzym B in den aT_{regs} und der durch sie ausgelösten Todesrate der Zielzellen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,765.

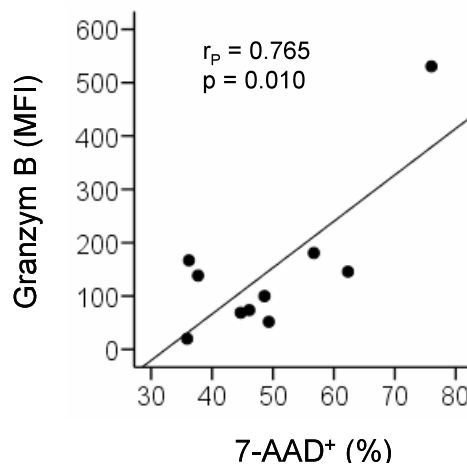


Abb. 3-16: Korrelation zwischen der Granzym-B-Synthese in aT_{regs} und deren zytotoxischem Potential. Dargestellt sind die gemessenen medianen Fluoreszenzintensitäten des Granzym B gegen den Prozentsatz 7-AAD-positiver K562 Zellen je Proband. Der Pearson-Korrelationskoeffizient (r_p) wurde ermittelt und das Signifikanzniveau auf $P < 0.05$ festgelegt.

Nachdem Granzym B als Auslöser der Zytotoxizität identifiziert wurde, stellte sich die Frage, ob das Zytokin Interleukin-4 durch die Hemmung der Granzym-B-Synthese auch inhibitorisch auf den aT_{reg}-induzierten Zelltod wirkt. In dem Versuchsblock 2 zeigte sich bereits, dass die Granzym-B-Synthese durch die Zugabe von Interleukin-4 deutlich reduziert wird. Der Mittelwert der Granzym-B-MFIs wurde in diesem Studienabschnitt erneut bestimmt und reduzierte sich von 147,6 auf 83,6. Aus diesem Grund wurde das zytotoxische Potential von aT_{regs} verglichen, die auf herkömmlichem Wege (IL-2/anti-CD3/anti-CD46) oder in Gegenwart von 100 ng/ml IL-4 induziert wurden. Es bestanden somit zwei Zellreihen: aT_{regs}, die bei ihrer Differenzierung unter dem Einfluss von IL-4 standen, und aT_{regs}, die sich ohne dem Einfluss des Zytokins entwickelten. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und mit K562 Zellen zusammengeführt. Die Co-Inkubation erfolgte mit einem Effektor/Target-Verhältnis von 10:1 für vier Stunden. Der Prozentsatz 7-AAD-positiver K562 Zellen diente wiederum als Maß für den aT_{reg}-induzierten Zelltod. Es zeigte sich, dass aT_{regs}, die in Gegenwart von 100 ng/ml IL-4 generiert wurden, signifikant weniger Zelltod in K562 Zellen induzierten als

herkömmlich generierte aT_{regs} . Bei den Respondern töteten die aT_{regs} unter IL-4 Einfluss 35,9 % der K562-Zellen, wohingegen es ohne Einfluss des Zytokins 46 % waren (Abb. 3-17).

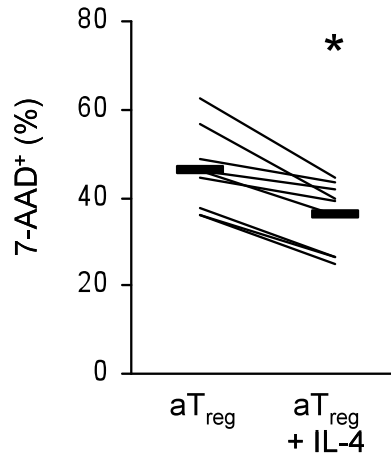


Abb. 3-17: Das zytotoxische Potential adaptiver $CD4^+$ T_{regs} wird durch IL-4 supprimiert. aT_{regs} wurden in Gegenwart von 100 ng/ml IL-4 bzw ohne Zugabe von IL-4 über 48 Stunden generiert und mit K562 Zellen für 4 Stunden co-inkubiert (Effektor/Target-Verhältnis 10:1). Der Prozentsatz 7-AAD-positiver K562 Zellen dient als Maß für den Zelltod. Die Ergebnisse von acht Probanden inklusive Mittelwert (-) sind dargestellt. Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels gepaartem t-Test ermittelt. *Das Signifikanzniveau wurde auf $P < 0,05$ festgelegt.

3.5 Einfluss von Interleukin-4 auf die Interleukin-10- und IFN- γ -Synthese in adaptiven regulatorischen $CD4^+$ Zellen

Die hier untersuchten, über IL-2, anti-CD3 und anti-CD46 generierten adaptiven T_{regs} üben ihre immunsupprimierende Funktion nicht nur mittels Granzym-B/Perforin-Weg aus, sondern ebenfalls über die Sekretion des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 (Kemper et al. 2003). Bisher wurde in den Studien II-III nur der Einfluss von Interleukin-4 auf die Synthese von Granzym B und die Granzym-B-vermittelte Zytotoxizität untersucht. Offen geblieben ist, ob IL-4 außerdem Einfluss auf die Synthese des Interleukins-10 nimmt. Adaptive T_{regs} wurden in Gegenwart unterschiedlicher IL-4 Konzentrationen (0,1 – 100 ng/ml) sowie ohne Zugabe von IL-4 generiert. Nach 2-tägiger Inkubation wurden die Konzentrationen von IL-10 und Interferon- γ in den Kulturüberständen der verschiedenen Ansätze bestimmt. Interferon- γ wurde als Kontrolle verwendet, da für dieses Zytokin bereits ein hemmender Effekt durch IL-4 bekannt ist und es somit zum Vergleich herangezogen werden kann. IL-4

induzierte, wie erwartet, eine konzentrationsabhängige Suppression der IFN- γ -Sekretion durch adaptive T_{regs} (Abb. 3-18). Die Konzentrationen von IL-10 in den Kulturüberständen blieb von der IL-4 Konzentration allerdings unbeeinflusst. Es zeigte sich kein signifikanter Abfall der IL-10-Produktion durch die Zugabe von IL-4 (Abb. 3-19).

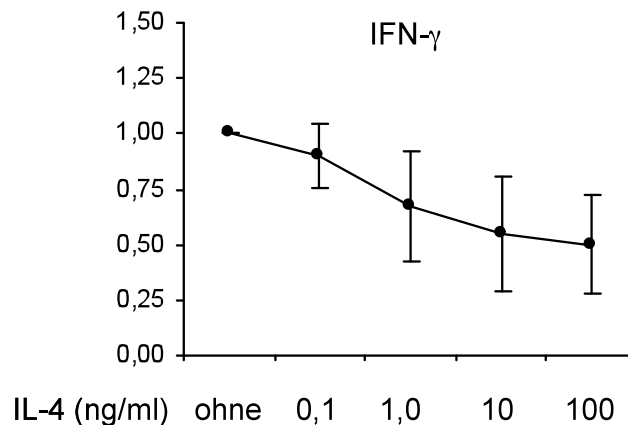


Abb. 3-18: Einfluss von Interleukin-4 auf die IFN- γ -Synthese adaptiver regulatorischer CD4⁺-Zellen. Dargestellt ist die relative IFN- γ -Konzentration bezogen auf den Kontrollansatz (ohne IL-4-Zugabe) von 5 Probanden.

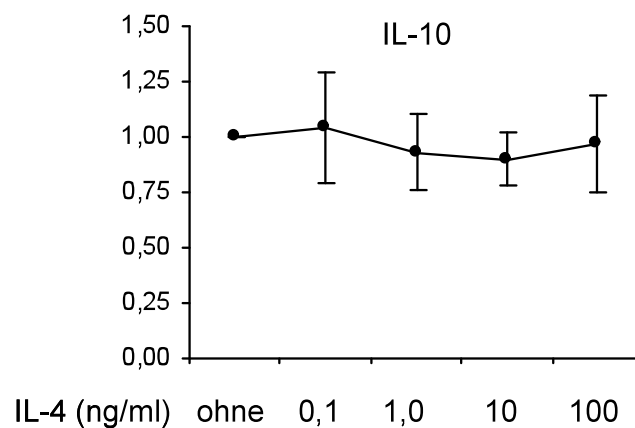


Abb. 3-19: Einfluss von Interleukin-4 auf die Interleukin-10-Synthese adaptiver regulatorischer CD4⁺-Zellen. Dargestellt ist die relative IL-10-Konzentration bezogen auf den Kontrollansatz (ohne IL-4-Zugabe) von 5 Probanden.

Interleukin-4 hat somit einen hemmenden Effekt auf die Granzym-B-Synthese der adaptiven regulatorischen CD4⁺ Zellen und reduziert damit ihr zytotoxisches Potential. Die Sekretion des Interleukin-10 durch die T_{regs} bleibt jedoch unbeeinflusst.

4 Diskussion

4.1 Die Induktion adaptiver regulatorischer CD4⁺ Zellen durch Stimulation von CD3 und CD46 in vitro und in vivo

Die in vivo in der Peripherie generierten adaptiven regulatorischen T-Zellen können über verschiedene Mechanismen auch in vitro induziert werden. Dabei zeigen sich je nach Verfahren Unterschiede bei den Zellen. Angelehnt an das in vivo vermutete Verfahren zeigten Roncarolo et al. 2001, dass der Kontakt mit Antigenpräsentierenden Zellen unter dem Einfluss von Interleukin-10 die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu adaptiven regulatorischen T-Zellen induziert. Diese Zellen unterscheiden sich durch ihre geringere Proliferationsrate von den T_R1-Zellen, die durch Stimulation mittels anti-CD3 und anti-CD46 induziert werden können (Kemper et al. 2003). Entsprechendes gilt für regulatorische CD4⁺ T-Zellen, die mittels Dexamethason und Vitamin D3 generiert werden (Mucida et al. 2007 & Barrat et al. 2002). Weitere Funktionen, wie die IL-10-Synthese, scheinen bei diesen in vitro induzierten aT_{regs} vergleichbar zu sein. Welche dieser in vitro generierten aT_{regs} jedoch den Eigenschaften der in vivo vorkommenden adaptiven T_{regs} am nächsten kommt, ist unklar.

CD46 ist ein Oberflächenmolekül, welches auf T-Zellen exprimiert wird und verschiedene Funktionen einnimmt. Im aktivierten Zustand bindet es zum einen die Komplementfaktoren C3b sowie C4b und schützt dadurch Zellen vor deren Lyse (Seya et al. 1989). Darüber hinaus vermag es T-Zellen in ihrer Funktion und Proliferation zu beeinflussen. Es bewirkt morphologische Modifikationen, welche die Migrations-eigenschaften der Zellen verändern (Zaffran et al. 2001) und beeinflusst die Zellpolarität und dadurch die Zellteilung (Oliario et al. 2006). Diese zentrale Rolle von CD46 bei der Regulation von T-Zellen bestätigte sich, als Kemper et al. 2003 zeigten, dass die Stimulation dieses Oberflächenmoleküls bei gleichzeitiger Stimulation von CD3 adaptive regulatorische T-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen induziert.

Die physiologische Bedeutung dieser Stimulation zeigt sich dadurch, dass *Streptococcus pyogenes* in der Lage ist, durch Stimulation von CD46 T_R1-Zellen zu induzieren und dadurch das Immunsystem zu hemmen. Das eigene Überleben wird so gewährleistet (Price et al. 2005). Außerdem dient das Oberflächenmolekül CD 46 als Eintrittsstelle für das Masernvirus (Kemper et al. 2009). Tumorzellen wirken über die Stimulation dieses Oberflächenmoleküls immunsuppressiv und verhindern so ihre

eigene Zerstörung. Die Blockade von CD46 reduziert in Tierversuchen die Überlebensfähigkeit von Tumorzellen und könnte somit eine zusätzliche Therapiemöglichkeit maligner Erkrankungen in der Zukunft darstellen (Yan et al. 2008). Eine weitere physiologische Relevanz zeigt die Studie von Astier et al. 2006. Ein Großteil der untersuchten Patienten, die an einer Multiplen Sklerose erkrankt sind, zeigen Defekte in den CD46-Molekülen. Die Induktion von IL-10-synthetisierenden T_R1 -Zellen ist bei diesen Patienten nicht möglich. Die Autoren schlossen daraus, dass die Differenzierung von adaptiven regulatorischen T-Zellen bei erkrankten Patienten nicht korrekt möglich ist, so dass diesen Patienten die immunsuppressive Komponente der Zellen fehlt. Diese Tatsachen zeigen, dass der Mechanismus über CD46 Immunsuppression auszulösen, ein physiologischer Mechanismus ist, der nicht nur in vitro sondern auch in vivo von entscheidender Bedeutung ist (Abb. 4-1).

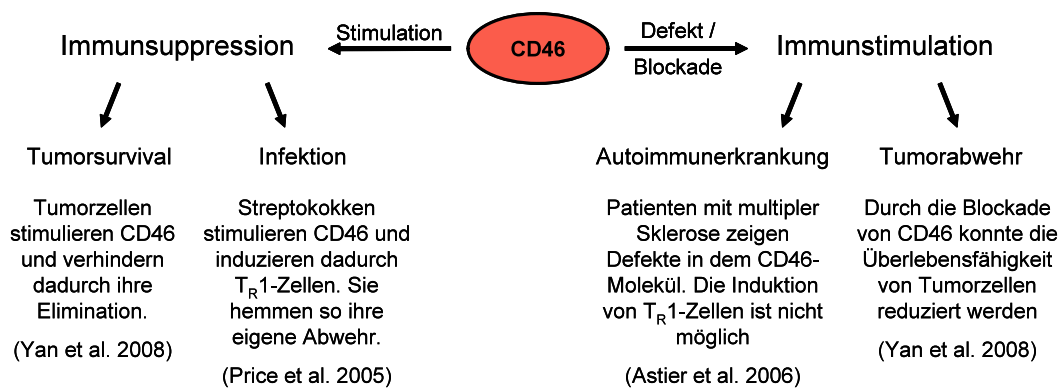


Abb. 4-1: Physiologie von CD46 in vivo. Dargestellt sind die Effekte, die in vivo via CD46 verursacht sind. Stimulation von CD46 bewirkt eine Immunsuppression, wodurch Tumorzellen und Bakterien ihr Überleben gewährleisten. Defekte oder Blockierungen des Moleküls erhöhen die Aktivität des Immunsystems und führen zu Autoimmunerkrankungen oder können zur Tumorabwehr genutzt werden.

Dass adaptive regulatorische Zellen auch im menschlichen Körper über diesen Mechanismus induziert werden, ist also nahe liegend, der direkte Beweis steht jedoch noch aus. Vor allem ist unklar, wann und durch welchen Stimulus die Zellen induziert werden. Eine direkte Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen aus dem Labor auf den Menschen ist somit nicht möglich. Die Ergebnisse sind jedoch richtungsweisend und bieten Möglichkeiten und Ideen für gezielte Analysen in vivo.

4.2 Die Bedeutung zytotoxischer Proteine für die Funktion regulatorischer CD4⁺ T-Zellen

4.2.1 Die Synthese von Granzym A, B und K in regulatorischen CD4⁺ T-Zellen

In dieser Arbeit wurde die Expression von den Granzymen A, B und K in adaptiven regulatorischen (T_R1-) CD4⁺ T-Zellen und regulär aktivierten CD4⁺ T-Zellen analysiert und miteinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei beiden Zellpopulationen die Synthese von Granzym B deutlich erhöht war, wohingegen die Granzyme A und K nur gering exprimiert wurden. Diese Ergebnisse entsprechen den von Grossman et al. 2004 (B) gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der Expression von Granzym A und B in T_R1-Zellen. Die CD4⁺ T-Zellen wurden in beiden Arbeiten nach der gleichen Methode isoliert und inkubiert und die Messungen erfolgten nach identischen Verfahren, so dass davon auszugehen ist, dass die in dieser Arbeit generierten aT_{regs} mit den von Kemper et al. 2003 und Grossman et al. 2004 (B) beschriebenen aT_{regs} vergleichbar sind.

Neben den Ergebnissen bezüglich der Granzyme A und B konnte keine gesteigerte Synthese von Granzym K festgestellt werden. Die adaptiven T_{regs} wirken demnach hauptsächlich durch die Synthese von Granzym B zytotoxisch. Dieses wurde ebenso 2004 durch Grossman et al. (A) beschrieben, wohingegen natürliche T_{regs} hauptsächlich Granzym A und nur wenig Granzym B synthetisieren. Ein Jahr später zeigten Gondek et al. allerdings, dass die natürlichen T_{regs} Granzym B und nicht Granzym A synthetisieren. Fraglich ist, welche Bedeutung die unterschiedlichen Ergebnisse haben. Bei der Studie von Gondek et al. 2005 wurden die natürlichen T_{regs} aus Mäusen gewonnen wohingegen Grossman et al. 2004 (A) humane Zellen untersuchten. Die nT_{regs} von Mäusen haben demnach nicht die exakt gleiche Funktion wie die der Menschen. Da die meisten Erkenntnisse, die bisher über regulatorische T-Zellen gewonnen werden konnten, auf Mausmodellen beruhen, lässt die Differenz der Zellen in dieser Hinsicht auch Unterschiede bei anderen Funktionen und Eigenschaften vermuten. Erwähnenswert ist weiterhin, dass bei beiden Studien die Zellen unterschiedlich stimuliert wurden. Gondek et al. isolierten natürliche regulatorische T-Zellen aus dem Mäuseblut und stimulierten sie anschließend mit anti-CD3 in Anwesenheit von IL-2. Grossman et al. fügten den Zellen außerdem noch anti-CD28 oder anti-CD46 hinzu,

wobei unter anti-CD46 höhere Granzym-A-Konzentrationen festzustellen waren als unter anti-CD28 Stimulation. Die zusätzliche Stimulation mit diesen Antikörpern könnte Unterschiede bei den Ergebnissen herbeiführen, wobei es fraglich ist, ob ein Wechsel der Granzym Expression dadurch erklärt werden kann.

Für T_{R1} -Zellen wurde bislang in allen Studien einheitlich die Synthese von Granzym B beschrieben, so dass hier keine widersprüchlichen Ergebnisse vorliegen. Allerdings stellen die T_{R1} -Zellen auch nur Zellen dar, die *in vitro* aus naiven $CD4^+$ Zellen mittels Stimulation von CD3 und CD46 induziert worden sind, so wie auch im Rahmen dieser Arbeit. So kann durch Wiederholung der Versuche unter hiesigen Laborbedingungen untersucht werden, ob die verwendeten Antikörper und weiteren Materialien ebenso die Stimulation und dadurch die zytotoxische Funktion der Zellen induzieren. Dies bildet die Grundlage für weitergehende Versuche und ist somit von essentieller Bedeutung.

Die Granzym-B-Expression zeigte sich, wie auch schon von Grossman et al. 2004 (B) beschrieben, in beiden Zellpopulationen, in den regulär aktivierten $CD4^+$ Zellen als auch in den T_{R1} -Zellen, erhöht. Dabei überstieg die Synthese in den adaptiven regulatorischen Zellen deutlich die der regulär aktivierten $CD4^+$ Zellen. Damit konnten mit den verwendeten Materialien die zu erwarteten Ergebnisse erzielt werden.

Die Synthese von Granzym B verleiht den regulatorischen T-Zellen zytotoxisches Potential. Unter den zytotoxischen Enzymen löst Granzym B am schnellsten und effizientesten die Apoptose aus (Heusel 1994 & Pardo et al. 2004). Die aT_{regs} nutzen somit den sichersten und effektivsten Weg, um durch das Abtöten von Zielzellen ihre Wirkung zu entfalten.

Die vielfachen Studien mit bestätigenden Ergebnissen über das zytotoxische Potential der Zellen lassen diese zu einer zentralen Funktion der Zellen werden. Mit Hilfe von Granzym B töten die aT_{regs} gezielt T-Zellen sowie antigenpräsentierende B-Zellen (Grossman et al. 2004 A, Gondek et al. 2005 & Zhao et al. 2006), reduzieren autoimmune Reaktionen (Qin et al. 2006), senken die Tumorcarence (Cao et al. 2007) und sind an der Aufrechterhaltung von Toleranz nach Transplantationen beteiligt (Gondek et al. 2008).

Bei all den Studien ist zu bemerken, dass hauptsächlich aus Mäusen isolierte natürliche T_{regs} oder *in vitro* induzierte adaptive T_{regs} analysiert worden sind. Wie *in vivo* generierte aT_{regs} wirken, ist zurzeit noch nicht endgültig geklärt. Die bisherigen Forschungsergebnisse lassen eine ebensolche Funktion auch bei den im menschlichen Körper induzierten T_{regs} vermuten (Kap. 4.1). Inwiefern die Resultate von *in vitro* auf in

vivo bzw. von der Maus auf den Menschen übertragbar sind, ist allerdings nicht bekannt. So zeigten Gondek et al. 2005, dass die Synthese von Granzym B in den natürlichen T_{regs} von Mäusen durch Stimulation des GITR (glucocorticoid-induced TNF-like receptor) gehemmt wird. Diese Wirkung konnte bislang an humanen nT_{regs} nicht nachgewiesen werden. Cardona et al. zeigten jedoch 2006 auf, dass Staphylokokken über den GITR inhibitorisch auf die humanen nT_{regs} wirken. Der Rezeptor nimmt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellen ein, der Zusammenhang zwischen dem Rezeptor und der Synthese zytotoxischer Enzyme konnte jedoch bislang nur an murinen Zellen nachgewiesen werden.

Differenzen liegen auch bei den adaptiven T_{regs} vor. Obwohl die Zellen bei den Studien immer humanen Ursprungs waren, unterscheiden sie sich je nach Induktionsverfahren. Neben schon bekannten Unterschieden und Gemeinsamkeiten, wie den unterschiedlichen Proliferationsraten bei gleicher IL-10-Synthese, ist unbekannt, inwiefern bezüglich der Granzym-B-Synthese Differenzen bestehen, und sollte in der Zukunft noch geklärt werden. Bislang konnte die Synthese von Granzym B nur in den T_{R1} -Zellen nachgewiesen werden. Die fortgeschrittenen Erkenntnisse bezüglich der Relevanz von CD46 bei der Immunregulation in vivo lassen diesen Induktionsweg auch im Menschen wahrscheinlich erscheinen und bestätigen somit die Relevanz der Forschungsergebnisse (s. Kap. 4.1).

4.2.2 Die Rolle von Perforin

Perforin hat eine porenformende Wirkung und ermöglicht dadurch Enzymen, wie dem Granzym B, den Durchtritt durch Membranen. Seine exakte Rolle im Zusammenhang mit dem Granzym-B-induzierten Zelltod ist unterschiedlich beschrieben worden. Dabei ist unklar an welcher Stelle des Ablaufes der Granzym-B-Wirkung Perforin effektiv wird und ob dies von essentieller Bedeutung ist oder lediglich unterstützend wirkt. Als Ansatzpunkt wird einerseits die äußere Zellmembran angesehen (Tschopp et al. 1986, Sauer et al. 1991, Shiver et al. 1991, Shiver et al. 1992 & Nakajima et al. 1995). So ermöglicht Perforin den Eintritt der zytotoxischen Enzyme in die Zelle. In anderen Studien wird vermutet, dass Perforin nicht den Eintritt der Enzyme in die Zelle bewirkt, sondern deren Ausschüttung aus Endosomen nach Endozytose herbeiführt (Froelich et al. 1996 & Shi et al. 1997). Neben den Unklarheiten, bezüglich des exakten Wirkmechanismus, wird ebenso widersprüchlich diskutiert, ob die zytotoxische Wirkung von Granzym B von Perforin abhängig ist oder lediglich unterstützt wird

(Motyka et al. 2000, Kagi et al. 1994, Lowin et al. 1994 & Kojima et al. 1994). Je nach Zelle und Wirkung scheint der Mechanismus unterschiedlich zu sein. Auch bei den regulatorischen T-Zellen konnte keine einheitliche Perforin-Abhängigkeit bewiesen werden. So stellten Grossman et al. 2004 (A) fest, dass die Zellen Perforin-abhängig zytotoxisch wirken. Sie begründen dies mit einer erhöhten Synthese von Perforin in T_{R1} -Zellen (Grossman et al. 2004 B). Zumindest die Expression von Perforin in den aT_{regs} konnte in dieser Arbeit mittels ELISA bestätigt werden. Grossman et al. führten Zytotoxizitätsassays durch und gaben teilweise die Inhibitoren EGTA oder Concanamycin A (CMA) hinzu. Sie konnten vor allem unter EGTA eine verminderte Zytotoxizität feststellen und erzielten somit die gleichen Ergebnisse wie in den Versuchen dieser Arbeit. Da EGTA die Kalzium-abhängige Polymerisation des Perforin inhibiert, wurde es von Grossman et al. als Perforin-spezifischer Inhibitor angesehen, so dass die Ergebnisse für eine Perforin-Abhängigkeit der T_{R1} -vermittelten Zytotoxizität via Granzym B sprechen. EGTA vermag allerdings durch die Bindung kovalenter Kationen nicht nur die Polymerisation von Perforin zu verhindern, sondern wirkt auch inhibitorisch auf die Granzym-B-abhängige zytotoxische Wirkung von plasmazytoiden Dendritischen Zellen, die kein Perforin synthetisieren (K. Bratke, mündliche Mitteilung). Das Kalzium, welches durch EGTA gebunden wird, wird ebenso für den Zellkontakt zwischen zytotoxischer Zelle und Zielzelle bei der Granula-vermittelten Apoptose benötigt (van Kooyk et al. 1991, Labadia et al. 1998 & Somersalo et al. 2004). Es kann also durch die inhibitorische Wirkung des EGTA nicht von einer Perforin-Abhängigkeit der Reaktion ausgegangen werden.

Aufgrund der Annahme, dass der Inhibitor CMA selbst zytotoxisches Potential besitzt, schlossen Grossman et al. 2004 (B) diesen aus weiteren Versuchen aus. Die Annahme der Perforin-Abhängigkeit basiert in der Studie demnach ausschließlich auf der Hemmung durch EGTA und muss somit kritisch gewertet werden.

Gondek et al. analysierten 2005 natürliche T_{regs} von Mäusen und stellten hierbei eine Perforin-Unabhängigkeit der Granzym-B-vermittelten Zytotoxizität fest. Die Zellen von Perforin-defizienten Mäusen zeigten sich ebenso effektiv wie die Zellen von Wildtyp-Mäusen. Die Anwesenheit von Perforin ist demnach für die zytotoxische Wirkung nicht notwendig. Wie schon in vorhergehenden Kapiteln erläutert unterliegen diese Ergebnisse wieder der Differenz zwischen menschlichen und murinen Zellen. Man kann mit Knockout-Mäusen, wie in diesem Fall, sehr eindeutige Ergebnisse erzielen, welche

jedoch nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die Funktionen im menschlichen Körper zulassen.

Eine Studie von Czystowska et al. 2010 beantwortet jedoch die Frage der Übertragbarkeit, indem gezeigt wurde, dass auch die aus dem menschlichen Blut isolierten natürlichen T_{regs} ihre Wirkung Perforin-unabhängig entfalten. Somit konnte zunächst in Mäusen, jetzt aber auch an menschlichen nT_{regs} , eine Unabhängigkeit der Granzym-B-vermittelten Zytotoxizität von Perforin gezeigt werden. Zudem wurde für humane basophile Granulozyten und humane plasmazytoide Dendritische Zellen ein Granzym-B-abhängiger, Perforin-unabhängiger Apoptosemechanismus beschrieben (Tschopp et al. 2006, Bratke et al. 2010), was zeigt, dass Perforin nicht in jedem Fall für den Granzym-B-vermittelten Zelltod essentiell ist.

Doch auch mit diesen Ergebnissen lässt sich weiterhin keine Aussage für die adaptiven T_{regs} machen. Eine Überschneidung in den Funktionen der natürlichen und der adaptiven T_{regs} ist nahe liegend, jedoch nicht bewiesen. Die Bedeutung des Perforins bei den aT_{regs} ist demnach weiterhin nicht aufgeklärt und kann nicht, wie von Grossman et al. 2004 (A) postuliert, als essentiell angesehen werden.

4.3 Beeinflussung der Granzym-B-Synthese in adaptiven regulatorischen Zellen durch Interleukin-4

Regulatorische T-Zellen stellen eine entscheidende inhibitorische Komponente des Immunsystems dar. Defekte oder Minderfunktionen der Zellen stehen im Zusammenhang mit Erkrankungen, die durch eine Überstimulation des Immunsystems gekennzeichnet sind. Zu diesen zählen Autoimmunerkrankungen (Sakaguchi et al. 1985) und Allergien (Akbari et al. 2003). Eine Stimulation der regulatorischen T-Zellen bewirkt hingegen eine vermehrte Toleranz, wie sie durch Tumorzellen induziert wird (Yan et al. 2008) und auch zur Verhinderung von Transplantatabstoßung genutzt werden kann (Chai et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor allem die Minderfunktion der Zellen im Zusammenhang mit Allergien analysiert.

Allergien sind überschießende immunologische Reaktionen auf körperfremde Antigene, die eigentlich nicht pathogen sind und somit von dem Immunsystem als ungefährlich eingestuft werden sollten (vgl. Kap. 1.1.1). Vermutet wird, dass bei diesen Krankheitsbildern die regulatorischen Zellen ihre inhibitorische Funktion, die bei

gesunden Menschen diese überschießenden Reaktionen unterdrückt, nicht ausreichend ausüben. Bei völligem Fehlen der Zellen kommt es wie beim IPEX-Syndrom zu autoimmun-endokrinen und allergischen Krankheitsbildern sowie zu einem Anstieg des IgE im Serum (Wildin et al. 2001, Chatila 2005). Dies zeigt eine Extremvariante mit sehr ausgeprägten immunologischen Reaktionen bei fehlender Inhibition durch die T_{regs} . Die überschießenden Immunantworten, wie sie bei Allergien vorliegen, begründen Veldman et al. 2006 mit einem Missverhältnis zwischen den proinflammatorischen T_H -Zellen und den antiinflammatorischen regulatorischen Zellen. Das Gleichgewicht zwischen den Zellen wird in Richtung Proinflammation verschoben. Veldman et al. schrieben in ihrer Arbeit, dass die Ursache für ein Missverhältnis auf drei verschiedenen Ebenen liegen kann. Zum einen können Unterschiede in den Zellquantitäten ursächlich sein. Dies konnte 2004 durch Akdis et al. bestätigt werden. Die Zahlen der regulatorischen Zellen im Blut von Allergikern sind im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigt (Akdis et al. 2004). Doch ebenso oder darüber hinaus könnten nach Veldman et al. eine Minderfunktion der T_{regs} und/oder eine Resistenz der proinflammatorischen Zellen gegenüber der inhibitorischen Wirkung der T_{regs} die überschießenden Reaktionen begründen. In dieser Arbeit wurde analysiert, ob neben den unterschiedlichen Zellquantitäten außerdem eine Minderfunktion der T_{regs} im allergischen Geschehen vorliegt. Dafür wurden die isolierten und stimulierten Zellen mit Interleukin-4 koinkubiert.

Interleukin-4 stellt, wie in Kap. 1.1.3 erläutert, das bedeutendste Zytokin bei dem Pathomechanismus allergischer Erkrankungen dar. Es interveniert auf jeder Ebene des Geschehens, von der Induktion der T_H2 -Zellen (Hsieh et al. 1992 & Seder et al. 1992) bis hin zum Isotypwechsel in den Plasmazellen (Geha et al. 2003). Aufgrund der enormen Bedeutung wurde analysiert, ob eine Fehlsteuerung dieses Botenstoffs ursächlich für allergische Erkrankungen ist. Es konnten verschiedene Genpolymorphismen detektiert werden, die vermutlich durch Beeinflussung der Synthese bzw. der Wirkung von IL-4 mit der Entstehung von Asthma und Allergien assoziiert sind. Die Veränderungen betreffen vor allem den IL-4-Promotor (Song et al. 1996 & Burchard et al. 1999) oder den IL-4-Rezeptor (Mitsuyasu et al. 1998, Hershey et al. 1997 & Kruse et al. 1999). Des Weiteren scheinen Infektionen mit *Ascaris lumbricoides* allergische Erkrankungen zu begünstigen und zu Anstiegen des IL-4 und IgE führen, wohingegen Infektionen mit anderen Parasiten protektiv wirken (Cooper 2009). Ob neben den genetischen Varianten und den bislang widersprüchlich

beschriebenen Einflüssen von parasitären Infektionen noch weitere Ursachen zu den erhöhten Zytokinwerten und den vermehrten IL-4-synthetisierenden Zellen im Blut führen, ist unklar und bedarf noch weiterer Aufklärung.

In dieser Arbeit wurde analysiert, ob dieses bei Allergien so entscheidende Zytokin Einfluss auf die Funktion der adaptiven regulatorischen T-Zellen nimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass Interleukin-4 die Granzym-B-Synthese in den T_R1 -Zellen deutlich und konzentrationsabhängig reduziert (Kap 3.2). Diese Ergebnisse waren jedoch nur bei etwa der Hälfte der Probanden, den so genannten Respondern, feststellbar. Bei den restlichen Probanden, den Nonrespondern, zeigten sich nicht so deutlich Ergebnisse. Die Werte der Granzym-B-Synthese zeigten sich durchgängig niedrig ohne Veränderungen bei den unterschiedlichen Zytokin-Konzentrationen. Um der Ursache dieser Differenz auf den Grund zu gehen, wurde bei allen Probanden die Konzentration von intrinsischem IL-4 bestimmt. Es stellte sich der Verdacht, dass bei den Nonrespondern schon ohne Zugabe des Zytokins erhöhte Konzentrationen desselben vorlagen und dadurch schon die Ausgangswerte erniedrigt waren. Die Ergebnisse der Analyse bestätigten den Verdacht. Die Werte des intrinsischen IL-4 lagen bei den Nonrespondern sehr deutlich über denen der Responder. Es waren demnach bei allen Ansätzen Werte feststellbar, die schon der inhibitorischen Funktion des IL-4 unterlagen. Es ließe sich spekulieren, dass bei diesen Probanden eine Erkrankung des allergischen Formenkreises vorliegt und sie deshalb die erhöhten Zytokin-Spiegel vorwiesen. Dies konnte durch Befragung der Probanden jedoch nicht bestätigt werden. Eine weiterführende Analyse dieser Zusammenhänge bei bekannt erkrankten Probanden, da diese vermeintlich noch höhere IL-4-Spiegel vorzuweisen hätten, könnte offene Fragen beantworten. Interessant wäre außerdem, zu analysieren, ab welchem Schwellenwert die Granzym-B-Synthese in regulatorischen T-Zellen durch intrinsisches IL-4 reduziert wäre und in welchem Zusammenhang dies mit der Prädisposition gegenüber allergischen Erkrankungen steht. Dass das T_H2 -Zytokin die Synthese des Granzym B zu beeinflussen vermag, ist jedoch eindeutig gezeigt worden. Dies erweitert die Funktion des Zytokins und beweist, dass die erhöhten Blutspiegel zu einer Inhibition der regulatorischen T-Zellen führen.

Der Einfluss von Interleukin-4 und anderen Allergie-spezifischen Markern (Tschopp et al. 2006) auf die Granzym-B-Synthese in anderen Zellen des Immunsystems wurde bereits in mehreren Studien analysiert. Kienzle zeigte in zwei Studien aus den Jahren 2002 und 2005 anhand eines Mausmodells, dass das Interleukin-4 die Granzym-B-

Synthese und somit die zytotoxische Funktion in T-Zellen hemmt. Bratke et al. erweiterten die Erkenntnisse 2006 indem sie zeigten, dass bei Asthmatikern durchschnittlich niedrigere Granzym-B-Konzentrationen in CD8⁺ T-Lymphozyten nachzuweisen waren als bei gesunden Probanden. In den NK-Zellen war dies allerdings nicht vorzufinden. Der Granzym-B-Spiegel im Serum erkrankter Personen war ebenfalls erniedrigt. Die Studie analysierte demnach nicht den direkten Effekt von IL-4. Da das Zytokin aber im Serum sowie in der Bronchoalveolären Lavage asthmatischer Probanden erhöht ist (Daher et al. 1995 & Walker et al. 1994), erlauben die Ergebnisse nach den Erkenntnissen von Kienzle et al. 2002 & 2005 indirekte Rückschlüsse.

Tschopp et al. untersuchten 2006 die veränderte Funktion basophiler Granulozyten im allergischen Milieu. Nach Stimulation der Zellen mittels Allergie-spezifischer Zytokine (IL-3) oder durch IgE-aktivierte Mastzellen stieg die Synthese von Granzym B in diesen Zellen deutlich an. Ebenso steigt die Synthese des Enzyms in endobronchialen plasmazytoiden dendritischen Zellen nach segmentaler Allergenprovokation an (Bratke et al. 2010). In der Studie von Tschopp et al. 2006 wurde nicht IL-4 als Allergie-spezifisches Zytokin verwendet. Erhöhte Konzentrationen des löslichen Granzym B konnte zudem nach Allergenprovokation in der Bronchiallavage asthmatischer Patienten detektiert werden (Bratke et al. 2004, Tschopp et al. 2006 & Bratke et al. 2010).

Somit bestehen in den verschiedenen Zellen konträre Veränderungen der Granzym-B-Synthese im allergischen Milieu. Bemerkenswert ist, dass sich die Inhibition der Synthese des zytotoxischen Enzyms auf T-Zellen zu beschränken scheint, wohingegen es in den anderen untersuchten Zellen des Immunsystems sogar zu gesteigerter Expression kommt. Im Serum chronisch erkrankter Asthma-Patienten zeigten sich erniedrigte Granzym-B-Konzentrationen, wohingegen diese nach Allergenprovokation in der bronchioalveolären Lavage erhöht waren. Buzza et al. stellten 2005 fest, dass extrazelluläres Granzym B zu Veränderungen in der Extrazellulärmatrix führt, welchem unter anderem eine wichtige Rolle bei dem Pathomechanismus des Asthma bronchiale zugesprochen wird.

In der Studie von Tschopp et al. wurden neben der Synthese des zytotoxischen Enzyms auch die Veränderungen in der Synthese anderer Produkte, vor allem von Zytokinen, analysiert. Unter IL-3 zeigte sich der größte Anstieg der Granzymsynthese und darüber hinaus auch der Synthese der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 in den basophilen Granulozyten. Interleukin-3 wird von aktivierten Mastzellen sezerniert (Gordon et al.

1990), die so die Effekte in den basophilen Zellen auslösen. Da in den Granulozyten neben der Granzym-B- auch die IL-4-Synthese ansteigt (Tschopp et al. 2006), tragen sie zu den erhöhten IL-4-Spiegeln bei Allergikern bei und hemmen dadurch unseren Ergebnissen zufolge die zytotoxische Funktion der aT_{regs} . So entsteht ein Teufelskreis, bei dem im allergischen Milieu die Zellen zu weiterer IL-4-Synthese angeregt werden.

Die erhöhten Interleukin-4-Spiegel bei allergischen bzw. asthmatischen Patienten resultieren nach dieser Arbeit neben den Effekten auf die zytotoxischen $CD8^+$ -T-Zellen ebenso in einer verminderten Zytotoxizität der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}). Die Zellen können andere Zellen des Immunsystems nicht oder nur eingeschränkt töten. Dadurch ist die Wirkung der T_{regs} als inhibitorische Komponente des Immunsystems reduziert und das von Veldman et al. 2006 beschriebene Verhältnis zwischen den proinflammatorischen T_H -Zellen und den antiinflammatorischen T_{regs} ist nicht mehr ausgeglichen, was zu den überschießenden Reaktionen bei Allergien beitragen könnte. Neben der von Akdis et al. 2004 beschriebenen reduzierten Quantität scheinen die Zellen somit auch qualitativ eingeschränkt im allergischen Milieu zu wirken. Dadurch sind bis jetzt zwei der drei möglichen Ursachen für das von Veldman et al. beschriebene Missverhältnis aufgeklärt. Ausstehend ist, ob als dritte Option proinflammatorische Zellen beim allergischen Geschehen refraktär gegenüber der inhibitorischen Wirkung regulatorischer T-Zellen sind.

Neben den Effekten des IL-4 auf die Granzym-B-Synthese wurde in dieser Arbeit ebenso die Beeinflussung der IL-10-Synthese analysiert. IL-10 wurde bislang als der Hauptmediator der regulatorischen T-Zellen angesehen und wurde in diversen Studien analysiert (Maloy et al. 2003, Groux et al. 1997, Kemper et al. 2006 & Saurer et al. 2009). Mehrere Studien zeigten jedoch, dass die Wirkung der regulatorischen T-Zellen nicht durch dieses Zytokin allein erklärt werden kann (Piccirillo et al. 2002). Daraufhin wurde die Synthese zytotoxischer Enzyme analysiert und bestätigt (Grossman et al. 2004 A & B). Kennzeichnend ist, dass Interleukin-4 die Synthese von Interleukin-10 in den regulatorischen T-Zellen nicht zu beeinflussen vermag (Kap. 3.5). Die Beeinflussung der regulatorischen T-Zellen durch Interleukin-4 beschränkt sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit auf die Granzym-B-Synthese. Im Zusammenhang mit Allergien scheint die IL-10-Synthese der T_{regs} demnach eine vermeintlich untergeordnete Rolle zu spielen, welches die Bedeutung von Granzym B weiter in den Vordergrund rückt.

Die zentrale Rolle der Granzym-B-Expression für die Funktion regulatorischer T-Zellen konnte in Bezug auf Autoimmunerkrankungen, Tumorabwehr sowie Transplantat-toleranz schon gezeigt werden (Qin et al. 2006, Cao et al. 2007 & Gondek et al. 2008), der Nachweis der ebenso entscheidenden Bedeutung bei allergischen Erkrankungen stand vor dieser Arbeit noch aus. Durch die beeinträchtigte Granzym-B-Synthese unter dem Einfluss von Interleukin-4 kann diese Lücke geschlossen werden, da zumindest diese Funktion der T_{regs} im Allergie-spezifischen Milieu nur unzureichend stattfindet.

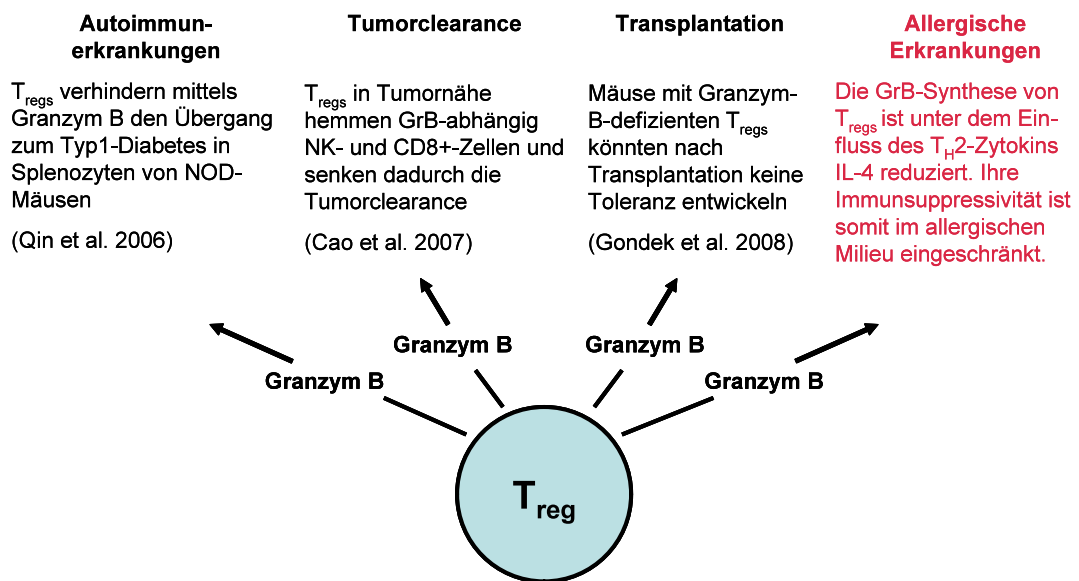


Abb. 4-2: Granzym-B-vermittelte Funktionen der regulatorischen T-Zellen. Die Bedeutung von Granzym-B-vermittelter Immunsuppression konnte in den vergangenen Jahren bereits durch Qin et al. 2006, Cao et al. 2007 sowie Gondek et al. 2008 in Bezug auf Autoimmunerkrankungen, Tumorcarence und Transplantation gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Ansatzpunkte, die die Bedeutung des zytotoxischen Enzyms auch bei allergischen Erkrankungen nahe legen.

4.4 Mögliche Bedeutung für den Pathomechanismus und die Therapie allergischer Erkrankungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Hinweise dafür, dass regulatorische T-Zellen durch ihre zytotoxische Funktion und deren Beeinflussbarkeit durch Interleukin-4 eine zentrale Rolle bei dem Pathomechanismus allergischer Erkrankungen einnehmen könnten. Die Versuche zeigen jedoch nur einen kleinen Ausschnitt des Geschehens auf, welches in seiner Komplexität noch nicht vollständig erfasst ist. Die durch Genpolymorphismen veränderte IL-4-Synthese bzw. -Wirkung kann eine bedeutende

Rolle einnehmen, durch die viele weitere Zellen und Reaktionen, so auch die T_{regs} , beeinflusst werden. Allerdings sind bei weitem nicht bei jedem erkrankten Patienten solche Mutationen nachweisbar. Dies kann zum einen daran liegen, dass noch nicht alle genetischen Varianten, die mit Allergien assoziiert sind, aufgeklärt werden konnten. Ferner möglich ist, dass noch weitere, nicht Gen-assoziierte Ursachen für allergische Erkrankungen vorliegen können. Es ist somit offen, ob Genvarianten die Grundlage einer jeden Allergie darstellen, die der mannigfaltigen Wirkung durch Umwelteinflüsse unterliegen oder ob weitere Faktoren die Fundamente der Erkrankungsursache darstellen. Diese Arbeit konnte die Kausalität der Erkrankung nicht weiter aufklären, trägt jedoch zum besseren Verständnis des Pathomechanismus der Fehlregulation bei. Dabei ist jedoch nicht bekannt in welchen Situationen die verminderte zytotoxische Funktion der T_{regs} zu dem Erkrankungsgeschehen beiträgt. Die erhöhten Granzym-B-Konzentrationen, die Bratke et al. 2004 und Tschopp et al. 2006 in den erwähnten Arbeiten beschrieben, wurden unter anderem nach Allergenprovokation und nach Stimulation durch IL-3 und IgE-aktivierten-Mastzellen festgestellt. Anhand dieser Methoden werden Akutsituationen des allergischen bzw. asthmatischen Geschehens analysiert. Die verminderte Granzym-B-Synthese in den $CD8^+$ -Zellen wird einer langfristigen Wirkung des Interleukin-4 zugeschrieben und kann möglicherweise die erhöhte Frequenz von viralen Atemwegsinfektionen in der Kindheit sowie die Chronifizierung atopisch-inflammatorischer Prozesse bei Asthmatikern durch verminderte Eliminierung von Entzündungszellen begründen (Bratke et al. 2006). Diesen Annahmen nach könnte es sein, dass eine gesteigerte Granzym-B-Synthese vor allem bei akuten Geschehen, wie einem Asthmaanfall, von entscheidender Bedeutung ist, wohingegen die reduzierte Synthese des Enzyms in den T-Zellen, T_{regs} eingeschlossen, zum chronischen Verlauf beiträgt. Die erste Fehlregulation bei allergischen Erkrankungen findet nach dem Erstkontakt mit dem Antigen statt. Die resultierende T_H2 -Antwort bewirkt eine Aktivierung von T_H2 -Zellen sowie einen Isotypwechsel der B-Zellen hin zur Synthese von IgE. Das Immunglobulin bindet an Mastzellen und bewirkt bei erneutem Allergenkontakt die Degranulation der Zellen, welche zu den klassischen Symptomen einer Allergie führt (Alvarez-Errico et al. 2009). Schon bei dieser ersten Reaktion müssten die T_{regs} inhibitorisch eingreifen, um weitere Reaktionen zu verhindern. Zu dieser Tatsache passt die Annahme, dass die verminderte Zytotoxizität zu der chronischen Prädisposition zur Entwicklung von Allergien beiträgt und nicht akute Reaktionen auslöst. Anzumerken ist jedoch, dass vermutlich die

Fehlregulation von IL-4 durch Genpolymorphismen, parasitäre Infektionen oder weiteren bislang nicht aufgeklärten Mechanismen chronisch verläuft und dadurch die T_{regs} in ihrer Funktion beeinträchtigt. Die Zellen stellen nicht die Ursache der Erkrankung, sondern eine Folge der IL-4-Fehlregulation dar.

Des Weiteren stellt sich die Frage, welche Zellen konkret durch die verminderte Zytotoxizität der T_{regs} nicht mehr oder nur noch eingeschränkt abgetötet werden. Passend zu der These, dass regulatorische T-Zellen und ihre reduzierte Granzym-B-Synthese zum chronischen Geschehen von Allergien beitragen, wäre zu vermuten, dass T_{regs} an Komponenten angreifen, welche die Affinität gegenüber Allergien erhöhen. So könnten Antigen-präsentierende Zellen oder T_{H2} -Zellen nicht mehr ausreichend inhibiert werden, was dazu führt dass sie ungehemmt aktiv werden und die T_{H2} -Antwort über dem physiologischen Maße hinaus induzieren (Lambrecht et al. 2000). Unpassend zu der These wäre eine verminderte Inhibition von Mastzellen oder eosinophilen Granulozyten durch die T_{regs} , da diese Zellen vor allem an dem Akutgeschehen einer allergischen Reaktion beteiligt sind (Alvarez-Errico et al. 2009).

An den gesamten Versuchen dieser Arbeit und vielen bisherigen Studien kritisch anzumerken ist, dass diese zumeist T_{R1} -Zellen nutzten, deren Identität in vivo nur angenommen, jedoch nicht endgültig bewiesen ist. Es ist demnach, wie auch schon in vorherigen Abschnitten diskutiert, keine direkte Übertragung der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus möglich. Erstrebenswert wäre eine weitere Aufklärung, ob T_{R1} -Zellen mit ihren Funktionen in dieser Form auch in vivo existieren. Darüber hinaus könnte die Analyse einer Beeinflussung der Synthese zytotoxischer Enzyme in humanen natürlichen T_{regs} unter IL-4 aufschlussreich sein und den Verdacht erhärten, dass diese Zellen im allergischen Milieu ebenso vermindert zur Granzym-Synthese befähigt sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die regulatorischen T-Zellen und ihre Funktionen lassen die Ergebnisse trotz dieser Unklarheiten sehr relevant erscheinen und bieten Ansätze für Therapien. Xystrakis et al. erzielten 2007 positive Ergebnisse, indem sie erkrankten Mäusen allergenspezifische T_{regs} transferierten und anschließend reduzierte inflammatorische Reaktionen und bronchiale Hyperreagibilität feststellen konnten. Sie glichen dadurch das Missverhältnis zwischen pro- und antiinflammatorischen Komponenten wieder aus und verbesserten dadurch den Erkrankungsverlauf. Diese Behandlungsform ist allerdings sehr aufwendig und im Alltag kaum realisierbar. Zudem

wirkt sie nur symptomatisch und nicht kausal. Aufgrund dessen bietet eine Therapie dieser Art kaum Möglichkeiten für die Zukunft.

Interleukin-4 stellt dennoch einen Schlüsselmechanismus der Erkrankungen des allergischen Formenkreises dar und bietet Behandlungsmöglichkeiten. Steinke et al. zeigten 2001, dass die Therapie mittels rekombinanten IL-4-Rezeptoren wirkungsvoll und nebenwirkungsarm bei Asthma eingesetzt werden kann. Die Patienten erhielten nach einem akuten Asthmaanfall zunächst Kortikosteroide, welche nach zwei Wochen durch die wöchentliche Gabe rekombinanter IL-4-Rezeptoren ersetzt wurde. Den verwendeten Rezeptoren fehlen transmembrane und zytoplasmatische Domänen, so dass sie keine Signalkaskade in Zellen auslösen. Die Rezeptoren binden das Interleukin-4 und verhindern dadurch den Kontakt des Zytokins mit den IL-4-Rezeptoren der Zellen. Unter der Behandlung mit den IL-4-Rezeptoren konnte eine Stabilität der Einsekundenkapazität nach dem Wechsel der Medikation festgestellt werden. Patienten, die ein Placebo erhielten, zeigten dahingegen Verschlechterungen der FEV₁. Die Wirkung der IL-4-Rezeptoren war demnach äquivalent zu den Kortikosteroiden. Dieses Ergebnis lässt hoffen, dass eine entsprechende Wirkung auch bei anderen allergischen Erkrankungen auftritt, die ebenfalls durch IL-4 induziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Interleukin-4 neben seiner Wirkung auf die Differenzierung von T_H2-Zellen auch die Funktion regulatorischer T-Zellen beeinflusst. Durch die oben beschriebene Therapie mit IL-4-Rezeptoren könnte die verminderte Granzym-B-Synthese in den regulatorischen T-Zellen aufgehoben werden, so dass diese uneingeschränkt zytotoxisch wirken und das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zellen wieder hergestellt wäre.

Durch diese Arbeit wird die Bedeutung des Interleukin-4 für die Pathomechanismen allergischer Erkrankungen erneut unter Beweis gestellt, da die T_{regs} in den letzten Jahren als die wichtigste inhibitorische Komponente des Immunsystems klassifiziert worden sind und ebenfalls in einer entscheidenden Funktion dem Einfluss dieses Zytokins unterliegen. Wenn bestätigt werden kann, dass diese Wirkung ebenfalls in vivo von Bedeutung ist, stellt die Regulation von IL-4 einen Erfolg versprechenden Ansatz für die medikamentöse Intervention bei Allergien und Heuschnupfen dar.

5 Zusammenfassung

Eine Allergie ist eine überschießende immunologische Reaktion auf eigentlich nicht pathogene, körperfremde Antigene. Charakteristisch ist die Synthese von T_H2 -Zytokinen wie Interleukin-4 und -13, welche die Allergie-spezifischen Reaktionen wie die Aktivierung von T_H2 -Zellen, den Isotypwechsel in B-Zellen hin zur Synthese von IgE und die Bindung dieser Immunglobuline an Mastzellen induzieren. IL-4 ist im Blut von Allergikern ebenso erhöht wie die Anzahl IL-4-synthetisierender Zellen.

Ursächlich für Allergien wird ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorisch wirkenden Zellen angesehen. Die inhibitorische Funktion übernehmen regulatorische T-Zellen, welche unter anderem IL-10 und TGF- β synthetisieren und dadurch Immunantworten hemmen. Es werden natürliche T_{regs} , welche im Thymus entstehen und adaptive T_{regs} , die in der Peripherie induziert werden, unterschieden. Die T_{regs} konnten in engen Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen gebracht werden, da bei ihrer Abwesenheit klassische allergische Symptome wie Urtikaria und erhöhte IgE-Spiegel im Blut auftreten.

In vitro können adaptive T_{regs} durch Stimulation von CD3 und CD46 aus $CD4^+$ T-Zellen induziert werden. Sie wirken über das Apoptose-auslösende Enzym Granzym B zytotoxisch. Die Bedeutung dieses immunregulatorischen Mechanismus von T_{regs} konnte bereits im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, Transplantationen und Tumorabwehr gezeigt werden.

IL-4 reduziert die Granzym-B-Expression in $CD8^+$ T-Zellen, woraufhin die Hypothese aufgestellt wurde, dass IL-4 die GrB-Expression ebenfalls in aT_{regs} reduziert. Dieses mindert deren Zytotoxizität und ihr antiinflammatorisches Potential. Um die Hypothese zu bestätigen, wurden die aT_{regs} in vitro induziert und die Granzym-B-Synthese der Zellen unter dem Einfluss des Zytokins analysiert. Die Synthese von Granzym B in aT_{regs} wurde konzentrationsabhängig durch die Zugabe von IL-4 reduziert, welches sich ebenso in einer reduzierten Zytotoxizität gegenüber K562 Zellen widerspiegelte. Dieser IL-4-induzierte Effekt war auf die Granzym-B-Synthese beschränkt, wohingegen die Synthese von IL-10 unbeeinflusst blieb.

Durch die vorliegende Arbeit konnte ein Mechanismus aufgezeigt werden, der zu der reduzierten Aktivität adaptiver regulatorischer T-Zellen im allergischen Milieu beitragen könnte. Die Granzym-B-vermittelte zytotoxische Wirkung dieser Zellen stellt somit nicht nur bei Autoimmunerkrankungen, Transplantationen und Tumorabwehr, sondern möglicherweise auch bei der Vermittlung von Toleranz gegenüber Allergenen einen bedeutenden Mechanismus dar.

6 Literaturverzeichnis

ADAMS JM.

Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003;
17(20):2481-95.

ADRAIN C, MURPHY BM, MARTIN SJ.

Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem.* 2005;
280:4663–4673.

AKBARI O, STOCK P, DEKRUYFF RH, UMETSU DT.

Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol.* 2003;
15:627–633

AKDIS M, BLASER K, AKDIS CA.

T regulatory cells in allergy. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91:159-73.

AKDIS M, VERHAGEN J, TAYLOR A, KARAMLOO F, KARAGIANNIDIS C,
CRAMERI R, ET AL.

Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells.
J Exp Med. 2004; 199:1567-75.

ALLERGOLOGIE-HANDBUCH

J. Saloga, L. Klimek, R. Buhl, W. Mann, J. Knop; 1. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart (2006).

ALVAREZ-ERRICO D, LESSMANN E, RIVERA J.

Adapters in the organization of mast cell signaling. *Immunol Rev.* 2009;
232(1):195-217.

AROCK M, ZUANY-AMORIM C, SINGER M, BENHAMOU M, PRETOLANI M.

Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur J Immunol.* 1996; 26(1):166-70.

ASANO M, TODA M, SAKAGUCHI N, SAKAGUCHI S.

Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med.* 1996; 184(2):387-96.

ASTIER AL, MEIFFREN G, FREEMAN S, HAFLER DA.

Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2006; 116:3252–7.

BANCHEREAU J, STEINMAN RM.

Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673):245-52.

BARRAT FJ, CUA DJ, BOONSTRA A, RICHARDS DF, CRAIN C, SVELKOUHL HF, DE WAAL-MALEFYT R, COFFMAN RL, HAWRYLOWICZ CM, O'GARRA A.

In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002; 195(5):603-16.

BASKETTER DA.

Chemistry of contact allergens and irritants. *Am J Contact Dermat.* 1998; 9(2):119-24.

BELLINGHAUSEN I, KLOSTERMANN B, KNOP J, SALOGA J.

Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111(4):862-8.

BERESFORD PJ, KAM CM, POWERS JC, LIEBERMAN J.

Recombinant human granzyme A binds to two putative HLA-associated proteins and cleaves one of them. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:9285–9290.

BERESFORD PJ, XIA Z, GREENBERG AH, LIEBERMAN J.

Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a rapid form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 1999; 10:585–594.

BERESFORD PJ, ZHANG D, OH DY, FAN Z, GREER EL, RUSSO ML ET AL.

Granzyme A activates an endoplasmic reticulum associated caspase-independent nuclease to induce single strand DNA nicks. *J Biol Chem.* 2001; 8:357–368.

BIRD CH, SUN J, UNG K, KARAMBALIS D, WHISSTOCK JC, TRAPANI JA ET AL.

Cationic sites on granzyme B contribute to cytotoxicity by promoting its uptake into target cells. *Mol Cell Biol.* 2005; 25:7854–7867.

BOPP T, BECKER C, KLEIN M ET AL.

Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007; 204:1303–10.

BRATKE K, BÖTTCHER B, LEEDER K, SCHMIDT S, KÜPPER M, VIRCHOW JC JR, LUTTMANN W.

Increase in granzyme B⁺ lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma.

Clin Exp Immunol. 2004; 136(3):542-8.

BRATKE K, HAUPT F, KUEPPER M, BADE B, FAEHNDRICH S, LUTTMANN W, VIRCHOW JC JR.

Decrease of cytotoxic T cells in allergic asthma correlates with total serum immunoglobulin E. *Allergy* 2006; 61(11):1351-7.

BRATKE K, NIELSEN J, MANIG F, KLEIN C, KUEPPER M, GEYER S, JULIUS P, LOMMATZSCH M, VIRCHOW JC JR.

Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 2010; Druck noch ausstehend.

BRUNKOW ME, JEFFERY EW, HJERRILD KA, PAEPER B, CLARK LB, YASAYKO SA, WILKINSON JE, GALAS D, ZIEGLER SF, RAMSDELL F.

Disruption of a new forkhead/wingedhelix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001; 27:68–73.

BURCHARD EG, SILVERMAN EK, ROSENWASSER LJ, BORISH L, YANDAVA C, PILLARI A, WEISS ST, HASDAY J, LILLY CM, FORD JG, DRAZEN JM.

Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV1 in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160:919–922.

BURKE W, FESINMEYER M, REED K, HAMPSON L, CARLSTEN C.

Family history as a predictor of asthma risk. *Am J Prev Med.* 2003; 24(2):160-9.

BUZZA MS, ZAMURS L, SUN J, BIRD CH, SMITH AI, TRAPANI JA, FROELICH CJ, NICE EC, BIRD PI.

Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem.* 2005; 280(25):23549-58.

CAO X, CAI SF, FEHNIGER TA, SONG J, COLLINS LI, PIWNICA-WORMS DR, LEY TJ.

Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007; 27(4):635-46.

CARDONA ID, GOLEVA E, OU LS, LEUNG DY.

Staphylococcal enterotoxin B inhibits regulatory T cells by inducing glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein ligand on monocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117(3):688-95.

CHAI JG, XUE SA, COE D, ADDEY C, BARTOK I, SCOTT D, SIMPSON E, STAUSS HJ, HORI S, SAKAGUCHI S, DYSON J.

Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25– T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation* 2005; 79:1310–1316.

CHAN SC, BROWN MA, WILLCOX TM, LI SH, STEVENS SR, TARA D, HANIFIN JM.

Abnormal IL-4 gene expression by atopic dermatitis T lymphocytes is reflected in altered nuclear protein interactions with IL-4 transcriptional regulatory element. *J Invest Dermatol.* 1996; 106:1131–1136.

CHATILA TA.

Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116(5):949-59.

CHEN W, JIN W, HARDEGEN N, LEI KJ, LI L, MARINOS N, MCGRADY G, WAHL SM.

Conversion of peripheral CD4+CD25– naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003; 198:1875–1886.

CHOWDHURY D, BERESFORD PJ, ZHU P, ZHANG D, SUNG JS, DEMPLE B ET AL.

The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell* 2006; 23:133–142.

CULLEN SP, MARTIN SJ.

Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.* 2008; 15(2):251-62.

CZYSTOWSKA M, STRAUSS L, BERGMANN C, SZAJNIK M, RABINOWICH H, WHITESIDE TL.

Reciprocal granzyme/perforin-mediated death of human regulatory and responder T cells is regulated by interleukin-2 (IL-2). *J Mol Med.* 2010; Druck noch ausstehend.

DAHER S, SANTOS LM, SOLE D, DE LIMA MG, NASPITZ CK, MUSATTI.

Interleukin-4 and soluble CD23 serum levels in asthmatic atopic children. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 1995; 5:251–254.

DAVIS JE, SUTTON VR, SMYTH MJ, TRAPANI JA.

Dependence of granzyme B-mediated cell death on a pathway regulated by Bcl-2 or its viral homolog, BHRF1. *Cell Death Differ.* 2000; 7:973–983.

DRESSEL R, RAJA SM, HONING S, SIELDER T, FROELICH CJ, VON FIGURA K ET AL.

Granzymemediated cytotoxicity does not involve the mannose-6-phosphate receptors on target cells. *J Biol Chem.* 2004; 279:20200–20210.

FAN Z, BERESFORD PJ, ZHANG D, LIEBERMAN J.

HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Mol Cell Biol.* 2002; 22:2810–2820.

FAN Z, BERESFORD PJ, HH DY, ZHANG D, LIEBERMAN J.

Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003 (A); 112:659–672.

FAN Z, BERESFORD PJ, ZHANG D, XU Z, NOVINA CD, YOSHIDA A ET AL.

Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol.* 2003 (B); 4:145–153.

FEHÉRVARI Z, SAKAGUCHI S.

Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16(2):203-8.

FINKELMAN FD, SHEA-DONOHUE T, GOLDHILL J, SULLIVAN CA, MORRIS SC, MADDEN KB, GAUSE WC, URBAN JF JR.

Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15:505-33.

- FROELICH CJ, ORTH K, TURBOV J, SETH P, GOTTLIEB R, BABIOR B ET AL.**
New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is required for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem.* 1996; 271:29073–29079.
- GEHA RS, JABARA HH, BRODEUR SR.**
The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination.
Nat Rev Immunol. 2003; 3(9):721-32.
- GEIGER B, ROSEN D, BERKE G.**
Spatial relationships of microtubule organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol* 1982; 95:137–143.
- GELL PGH, COOMBS RRA.**
Clinical Aspects of Immunology, 2. Auflage, 1968, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- GERSHON RK, COHEN P, HENCIN R, LIEBHABER SA.**
Suppressor T cells. *J Immunol* 1972; 108:586–90.
- GONDEK DC, DEVRIES V, NOWAK EC, LU LF, BENNETT KA, SCOTT ZA, NOELLE RJ.**
Transplantation survival is maintained by granzyme B+ regulatory cells and adaptive regulatory T cells. *J Immunol.* 2008; 181(7):4752-60.
- GONDEK DC, LU LF, QUEZADA SA, SAKAGUCHI S, NOELLE RJ.**
Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005; 174:1783–1786.
- GORDON JR, BURD PR, GALLI SJ.**
Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990; 11(12):458-64.
- GRIFFITHS GM.**
Endocytosing the death sentence. *J Cell Biol.* 2003; 160:155–156.
- GRINDEBACKE H, WING K, ANDERSSON A, SURI-PAYER E, RAK S, RUDIN A.**
Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergies during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(9):1364-72.

GROSSMAN WJ, VERBSKY JW, BARCHET W, COLONNA M, ATKINSON JP, LEY TJ.

Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004 (A); 21:589–601.

GROSSMAN WJ, VERBSKY JW, TOLLEFSEN BL, KEMPER C, ATKINSON JP, LEY TJ.

Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004 (B); 104:2840–8.

GROUX H, O’GARRA A, BIGLER M, ROULEAU M, ANTONENKO S, DE VRIES JE, RONCAROLO MG.

A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737–742.

GU Y, SARNECKI C, FLEMING MA, LIPPKE JA, BLEACKLEY RC, SU MS.

Processing and activation of CMH-1 by granzyme B. *J Biol Chem.* 1996; 271:10816–10820.

HERSHEY GKK, FRIEDRICH MF, ESSWEIN LA, THOMAS ML, CHATILA TA.

The association of atopy with a gain-of-function mutation in the α subunit of the interleukin-4 receptor. *New Engl J Med.* 1997; 337:1720–1725.

HEUSEL JW, WESSELSCHMIDT RL, SHRESTA S, RUSSELL JH, LEY TJ.

Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994; 76:977–987.

HILL MM, ADRAIN C, DURIEZ PJ, CREAGH EM, MARTIN SJ.

Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J.* 2004; 23:2134–2145.

HINZ D, SIMON JC, MAIER-SIMON C, MILKOVA L, RÖDER S, SACK U, BORTE M, LEHMANN I, HERBERTH G.

Reduced maternal regulatory T cell numbers and increased T helper type 2 cytokine production are associated with elevated levels of immunoglobulin E in cord blood. *Clin Exp Allergy* 2010; 40(3):419-26.

HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S.

Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057–1061.

HSIEH CS, HEIMBERGER AB, GOLD JS, O'GARRA A, MURPHY KM.

Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system.

Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:6065–6069.

HSIEH CS, LIANG Y, TYZNIK AJ, SELF SG, LIGGITT D, RUDENSKY AY.

Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 2004; 21:267–277.

IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE

CA Janeway, P Travers, M Walport; 5. Auflage, Garland Publishing Inc; London (2001)

JACOBSON MD, WEIL M, RAFF MC.

Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88(3):347-54.

JEANNIN P, LECOANET S, DELNESTE Y, GAUCHAT JF, BONNEFOY JY.

IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol.* 1998; 160(7):3555-61.

JI HB, LIAO G, FAUBION WA, ABADÍA-MOLINA AC, COZZO C, LAROUX FS, CATON A, TERHORST C.

Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol.* 2004; 172(10):5823-7.

JIANG X, WANG X.

Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem.* 2000; 275:31199–31203.

JOHANSSON SG, BIEBER T, DAHL R, FRIEDMANN PS, LANIER BQ, LOCKEY RF, MOTALA C, ORTEGA MARTELL JA, PLATTS-MILLS TA, RING J, THIEN F, VAN CAUWENBERGE P, WILLIAMS HC.

Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113(5):832-6.

JONULEIT H, SCHMITT E, STASSEN M, TUETTENBERG A, KNOP J, ENK AH.

Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* 2001; 193:1285–1294.

JULIA V, MCSORLEY SS, MALHERBE L, BREITTMAYER JP, GIRARD-PIPAU F, BECK A, GLAICHENHAUS N.

Priming by microbial antigens from the intestinal flora determines the ability of CD4+ T cells to rapidly secrete IL-4 in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol.* 2000; 165(10):5637-45.

KAGI D, LEDERMANN B, BURKI K, SEILER P, ODERMATT B, OLSEN KJ ET AL.

Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994; 369:31–37.

KEEFE D, SHI L, FESKE S, MASSOL R, NAVARRO F, KIRCHHAUSEN T ET AL.

Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 2005; 23:249–262.

KEMPER C, ATKINSON JP.

Measles virus and CD46. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009; 329:31-57.

KEMPER C, CHAN AC, GREEN JM, BRETT KA, MURPHY KM, ATKINSON JP.

Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003; 421:388–92.

KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4):239-57.

KIENZLE N, BUTTIGIEG K, GROVES P, KAWULA T, KELSO A.

A clonal culture system demonstrates that IL-4 induces a subpopulation of noncytolytic T cells with low CD8, perforin, and granzyme expression. *J Immunol.* 2002; 168:1672–81.

KIENZLE N, OLVER S, BUTTIGIEG K, GROVES P, JANAS ML, BAZ A, KELSO A.

Progressive differentiation to a poorly cytolytic CD8^{low} phenotype in the presence of IL-4. *J Immunol.* 2005; 174:2021–9.

KIM JM, RUDENSKY A.

The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006; 212:86-98.

KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMAYER DD.

The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275:1132–1136.

KOJIMA H, SHINOHARA N, HANAOKA S, SOMEYA-SHIROTA Y, TAKAGAKI Y, OHNO H ET AL.

Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1994; 5:357–364.

KRUSE S, JAPHA T, TEDNER M, SPARHOLT SH, FORSTER J, KUEHR J, DEICHMANN KA.

The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor α gene are associated with atopy and influence signal transduction. *Immunology* 1999; 96:365–371.

KRYSKO DV, VANDEN BERGHE T, D'HERDE K, VANDENABEELE P.

Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008; 44:205-221.

KUPFER A, DENNERT G, SINGER SJ.

Polarization of the Golgi apparatus and the microtubuleorganizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:7224–7228.

KUPFER A, DENNERT G.

Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol.* 1984; 133:2762–2766.

KUPFER A, DENNERT G, SINGER SJ.

The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. *J Mol Cell Immunol.* 1985; 2:37–49.

KUWANA T, MACKEY MR, PERKINS G, ELLISMAN MH, LATTERICH M, SCHNEITER R ET AL.

Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; 111:331–342.

LABADIA ME, JEANFAVRE DD, CAVINESS GO, MORELOCK MM.

Molecular regulation of the interaction between leukocyte function-associated antigen-1 and soluble ICAM-1 by divalent metal cations. *J Immunol.* 1998; 161(2):836-42.

LAMBRECHT BN, DE VEERMAN M, COYLE AJ, GUTIERREZ-RAMOS JC, THIELEMANS K, PAUWELS RA.

Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest.* 2000; 106(4):551-9.

LEONARD C, TORMEY V, BURKE C, POULTER LW.

Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 17:368–375.

LI H, ZHU H, XU C, YUAN J.

Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94:491–501.

LING EM, SMITH T, NGUYEN XD, PRIDGEON C, DALLMAN M, ARBERY J, CARR VA, ROBINSON DS.

Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363(9409):608-15.

LOWIN B, BEERMANN F, SCHMIDT A, TSCHOPP J.

A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11571–11575.

LÜTHI AU, MARTIN SJ.

The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2007; 14(4):641-50.

LUO X, BUDIHardjo I, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X.

Bid, a Bcl-2 protein, mediates the release of cytochrome c from mitochondria in response to cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94:481–490.

MACDONALD G, SHI L, VANDE VELDE C, LIEBERMAN J, GREENBERG AH.

Mitochondriadependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1999; 189:131–144.

MALOY KJ, SALAUN L, CAHILL R, DOUGAN G, SAUNDERS NJ, POWRIE F.

CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med.* 2003; 197:111–119.

MAROUF W, SIEB JP.

Myasthenia gravis and myasthenic syndromes. *Z Rheumatol.* 2009; 68(6):465-70.

MARTIN SJ, ARAMANTE-MENDES GP, SHI L, CHUANG TH, CASIANO CA, O'BRIEN GA ET AL.

The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J.* 1996; 15:2407–2416.

MASSON D, TSCHOPP J.

A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* 1987; 49:679–685.

MASSON D, ZAMAI M, TSCHOPP J.

Identification of granzyme A isolated from cytotoxic T-lymphocyte-granules as one of the proteases encoded by CTL-specific genes. *FEBS Lett.* 1986; 208:84–88.

MEDEMA JP, TOES RE, SCAFFIDI C, ZHENG TS, FLAVELL RA, MELIEF CJ ET AL.

Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol.* 1997; 27:3492–3498.

METKAR SS, WANG B, EBBS ML, KIM JH, LEE YJ, RAJA SM ET AL.

Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol.* 2003; 160:875–885.

MITSUYASU H, IZUHARA K, MAO XQ, GAO PS, ARINOBU Y, ENOMOTO T, KAWAI M, SASAKI S, DAKE Y, HAMASAKI N, SHIRAKAWA T, HOPKIN JM.

Ile50Val variant of IL4Ra upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet.* 1998; 19:119–120.

MOLLER G.

Do suppressor T cells exist? *Scand J Immunol.* 1988; 27:247–50.

MORGAN ME, VAN BILSEN JH, BAKKER AM ET AL.

Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4 + CD25 + T regulatory cells in humans. *Hum Immunol.* 2005; 66:13–20.

MOTYKA B, KORBUTT G, PINKOSKI MJ, HEIBEIN JA, CAPUTO A, HOBMAN M ET AL.

Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 2000; 103:491–500.

MUCIDA D, PARK Y, KIM G, TUROVSKAYA O, SCOTT I, KRONENBERG M, CHEROUTRE H.

Reciprocal TH17 and regulatory T cell Differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007; 317:256–60.

MUTIUS E, VON.

Atopy and asthma. *Internist (Berl)* 2008; 49(11):1295-6, 1298, 1300-1.

NAKAJIMA H, PARK HL, HENKART PA.

Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med.* 1995; 181:1037–1046.

NIJHAWAN D, BUDIHARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, LI P ET AL.

Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479–489.

NISHIMURA E, SAKIHAMA T, SETOGUCHI R, TANAKA K, SAKAGUCHI S.

Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004; 16:1189–1201.

NOURI-ARIA KT, WACHHOLZ PA, FRANCIS JN, JACOBSON MR, WALKER SM, WILCOCK LK, STAPLE SQ, AALBERSE RC, TILL SJ, DURHAM SR.

Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol.* 2004; 172(5):3252-9.

OLIARO J, PASAM A, WATERHOUSE NJ, BROWNE KA, LUDFORD-MENTING MJ, TRAPANI JA, RUSSELL SM.

Ligation of the cell surface receptor, CD46, alters T cell polarity and response to antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:18685–90.

PACHOLCZYK R, KERN J, SINGH N, IWASHIMA M, KRAJ P, IGNATOWICZ L.

Nonspecific antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells. *Immunity* 2007; 27:493–504.

PARDO J, BOSQUE A, BREHM R, WALLICH R, NAVAL J, MULLBACHER A ET AL.

Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol.* 2004; 167:457–468.

PAWANKAR R, OKUDA M, YSSEL H, OKUMURA K, RA C.

Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells.

J Clin Invest. 1997; 99:1492–1499.

PICCINNI MP, BELONI L, GIANNARINI L, LIVI C, SCARSELLI G, ROMAGNANI S, MAGGI E.

Abnormal production of T helper 2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5 by T cells from newborns with atopic parents. *Eur J Immunol.* 1996; 26:2293–2298.

PICCIRILLO CA, LETTERIO JJ, THORNTON AM, MCHUGH RS, MAMURA M, MIZUHARA H, SHEVACH EM.

CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness.

J Exp Med. 2002; 196:237–246.

PINKOSKI MJ, WATERHOUSE NJ, HEIBEIN JA, WOLF BB, KUWANA T, GOLDSTEIN JC ET AL.

Granzyme B-mediated apoptosis precedes predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276:12060–12067.

PODACK ER, YOUNG JD, COHN ZA.

Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:8629–8633.

PRICE JD, SCHAUMBURG J, SANDIN C, ATKINSON JP, LINDAHL G, KEMPER C.

Induction of a regulatory phenotype in human CD4⁺ T cells by streptococcal M protein. *J Immunol.* 2005; 175(2):677-84.

QIN HY, MUKHERJEE R, LEE-CHAN E, EWEN C, BLEACKLEY RC, SINGH B.

A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int Immunol.* 2006; 18(7):1001-15.

RAJAN TV.

The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunology* 2003; 24(7):376-9.

REMUZZI G, ZOJA C, BERTANI T.

Glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1993; 2(3):465-74.

RIEDLER J, BRAUN-FAHRLÄNDER C, EDER W, SCHREUER M, WASER M, MAISCH S, CARR D, SCHIERL R, NOWAK D, VON MUTIUS E; ALEX STUDY TEAM.

Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001; 358(9288):1129-33.

RKI (Robert-Koch-Institut, www.rki.de).

Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie, Nicht übertragbare Krankheiten, Allergien, 2009.

ROBINSON DS, LARCHE M, DURHAM SR.

Tregs and allergic disease. *J Clin Invest.* 2004; 114:1389-97.

RONCAROLO MG, BACCHETTA R, BORDIGNON C, NARULA S, LEVINGS MK.

Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001; 182:68-79.

ROTHSTEIN TL, MAGE M, JONES G, MCHUGH LL.

Cytotoxic T lymphocyte sequential killing of immobilized allogeneic tumor target cells measured by time-lapse microcinematography. *J Immunol.* 1978; 121:1652-16656.

ROYER B, VARADARADJALOU S, SAAS P, GUILLOSSON JJ, KANTELIP JP, AROCK M.

Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(5):694-704.

SAKAGUCHI S, FUKUMA K, KURIBAYASHI K, MASUDA T.

Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease.

J Exp Med. 1985; 161:72-87.

SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N, ASANO M, ITOH M, TODA M.

Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.

J Immunol. 1995; 155(3):1151-64.

SAUER H, PRATSCH L, TSCHOPP J, BHAKDI S, PETERS R.

Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis.

- Biochim Biophys Acta*. 1991; 1063:137–146.
- SAURER L, MUELLER C.
T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy* 2009; 64(4):505-19.
- SEDER RA, PAUL WE, DAVIS MM, FAZEKAS DE ST GROTH B.
The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*. 1992; 176:1091–1098.
- SEYA T, ATKINSON JP.
Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J*. 1989; 264:581–8.
- SHI L, KAM CM, POWERS JC, AEBERSOLD R, GREENBERG AH.
Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med*. 1992 (A); 176:1521–1529.
- SHI L, KEEFE D, DURAND E, FENG H, ZHANG D, LIEBERMAN J.
Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the time as perforin to trigger apoptosis. *J Biol Chem*. 2005; 174:5456–5461.
- SHI L, KRAUT RP, AEBERSOLD R, GREENBERG AH.
A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med*. 1992 (B); 175:553–566.
- SHI L, MAI S, ISRAELS S, BROWNE K, TRAPANI JA, GREENBERG AH.
Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med*. 1997; 185:855–866.
- SHIMIZU J, YAMAZAKI S, TAKAHASHI T, ISHIDA Y, SAKAGUCHI S.
Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002; 3(2):135-42.
- SHIVER JW, HENKART PA.
A noncytotoxic mast cell tumor line exhibits potent IgE-dependent cytotoxicity after transfection with the cytolysin/perforin gene. *Cell* 1991; 64:1175–1181.
- SHIVER JW, SU L, HENKART PA.
Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* 1992; 71:315–322.

SHRESTA S, PHAM CT, THOMAS DA, GRAUBERT TA, LEY TJ.

How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol.* 1998; 10:581–587.

SLEE EA, ADRAIN C, MARTIN SJ.

Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6:1067–1074.

SLOOP GD, FRIEDBERG RC.

Complications of blood transfusion. How to recognize and respond to noninfectious reactions. *Postgrad Med.* 1995; 98(1):159-62, 166, 169-72.

SOJKA DK, HUANG YH, FOWELL DJ.

Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 2008; 124(1):13-22.

SOMERSALO K, ANIKEEVA N, SIMS TN, THOMAS VK, STRONG RK, SPIES T, LEBEDEVA T, SYKULEV Y, DUSTIN ML.

Cytotoxic T lymphocytes form an antigen-independent ring junction. *J Clin Invest.* 2004; 113(1):49-57.

SONG Z, CASOLARO V, CHEN R, GEORAS SN, MONOS D, ONO SJ.

Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J Immunol.* 1996, 156:424–429.

STEINKE JW, RICH SS, BORISH L.

5. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121(2 Suppl):S384-7; quiz S416.

STINCHCOMBE JC, BOSSI G, BOOTH S, GRIFFITHS GM.

The Immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001; 15:751–761.

STINCHCOMBE JC, MAJOROVITS E, BOSSI G, FULLER S, GRIFFITHS GM.

Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 2006; 443:462–465.

SURI-PAYER E, AMAR AZ, THORNTON AM, SHEVACH EM.

CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells.

J Immunol. 1998; 160:1212–1218.

SUTTON VR, WOWK ME, CANCELLA M, TRAPANI JA.

Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* 2003; 18:319–329.

TAAMS LS, VUKMANOVIC-STEJIC M, SMITH J, DUNNE PJ, FLETCHER JM, PLUNKETT FJ, EBELING SB, LOMBARDI G, RUSTIN MH, BIJLSMA JW, LAFEVER FP, SALMON M, AKBAR AN.

Antigen-specific T cell suppression by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2002; 32(6):1621-30.

TAKAHASHI T, TAGAMI T, YAMAZAKI S, UEDE T, SHIMIZU J, SAKAGUCHI N, MAK TW, SAKAGUCHI S.

Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000; 192:303–310.

TAKANASKI S, NONAKA R, XING Z, O'BYRNE P, DOLOVICH J, JORDANA M.

Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med.* 1994; 180(2):711-5.

THOMAS DA, DU C, XU M, WANG X, LEY TJ.

DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 2000; 12:621–632.

THOMPSON EB.

Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 1994; 8(6):665-73.

TRAPANI JA, SUTTON VR, THIA KYT, LI QL, FROELICH CJ, JANS DA ET AL.

A clathrin/dynamin and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J Cell Biol.* 2003; 160:223–233.

TSCHOPP J, MASSON D, SCHAFER S.

Inhibition of the lytic activity of perforin by lipoproteins. *J Immunol.* 1986; 137:1950–1953.

TSCHOPP CM, SPIEGL N, DIDICHENKO S, LUTMANN W, JULIUS P, VIRCHOW JC, HACK CE, DAHINDEN CA.

Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. *Blood* 2006 Oct 1; 108(7):2290-9.

UEDA N, SHAH SV.

Apoptosis. *J Lab Clin Med.* 1994; 124(2):169-77.

VANDENDRIES ER, DREWS RE.

Drug-associated disease: hematologic dysfunction. *Crit Care Clin.* 2006; 22(2):347-55, viii.

VAN KOOYK Y, WEDER P, HOGERVORST F, VERHOEVEN AJ, VAN SEVENTER G, TE VELDE AA, BORST J, KEIZER GD, FIGDOR CG.

Activation of LFA-1 through a Ca²(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *J Cell Biol.* 1991; 112(2):345-54.

VELDMAN C, NAGEL A, HERTL M.

Type I regulatory T cells in autoimmunity and inflammatory diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; 140(2):174-83.

VIEIRA PL, CHRISTENSEN JR, MINAEE S, O'NEILL EJ, BARRAT FJ, BOONSTRA A, BARTHLOTT T, STOCKINGER B, WRAITH DC, O'GARRA A.

IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2004; 172(10):5986-93.

VYAS YM, MANIAR H, DUPONT B.

Cutting edge: differential segregation of the SRC homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 within the early NK cell immune synapse distinguishes noncytolytic from cytolytic interactions. *J Immunol.* 2002; 168:3150–3154.

WALKER C, BAUER W, BRAUN RK, MENZ G, BRAUN P, SCHWARZ F, HANSEL TT, VILLIGER B.

Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150:1038–1048.

WATERHOUSE NJ, SEDELIES KA, BROWNE KA, WOWK ME, NEWBOLD A, SUTTON VR ET AL.

A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2005; 280:4476–4482.

WATERHOUSE NJ, SEDELIES KA, SUTTON VR, PINKOSKI MJ, THIA KY, JOHNSTONE R ET AL.

Functional dissociation of DeltaPsim and cytochrome c release defines the contribution of mitochondria upstream of caspase activation during granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006; 13:607–618.

WEETMAN AP.

Grave's disease 1835-2002. *Horm Res.* 2003; 59 Suppl 1:114-8.

WEIßBUCH ALLERGIE IN DEUTSCHLAND 2004.

Ring J, Fuchs T, Schultze-Wernighaus G: Weißbuch Allergie in Deutschland. Urban & Vogel, München (2004).

WHO 2002.

Prevention of Allergy and Allergic Asthma. Based on the WHO/WAO Meeting on the Prevention of Allergy and Allergic Asthma, Geneva, 8-9 January 2002.

WILDIN RS, RAMSDELL F, PEAKE J, FARAVELLI F, CASANOVA JL ET AL.

X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001; 27:18–20.

WILLS-KARP M, SANTELIZ J, KARP CL.

The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1(1):69-75.

WONG J, OBST R, CORREIA-NEVES M, LOSYEV G, MATHIS D, BENOIST C.

Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+ T cells. *J Immunol.* 2007; 178:7032–41.

XU H, DI IULIO NA, FAIRCHILD RL.

T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1996; 183(3):1001-12.

XYSTRAKIS E, URRY Z, HAWRYLOWICZ CM.

Regulatory T cell therapy as individualized medicine for asthma and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007; 7(6):535-41.

YAN J, ALLENDORF DJ, LI B, YAN R, HANSEN R, DONEV R.

The role of membrane complement regulatory proteins in cancer immunotherapy. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 632:159-74.

ZAFFRAN Y, DESTAING O, ROUX A, ORY S, NHEU T, JURDIC P, RABOURDIN-COMBE C, ASTIER AL.

CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogene-activated protein kinase. *J Immunol.* 2001; 167:6780–5.

ZHAO DM, THORNTON AM, DIPAOLO RJ, SHEVACH EM.

Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006; 107(10):3925-32.

ZHAO T, ZHANG H, GUO Y, ZHANG Q, HUA G, LU H ET AL.

Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein SET to induce single-stranded DNA nicks of target cells. *Cell Death Differ.* 2007 (A); 14:489–499.

ZHAO T, ZHANG H, GUO Y, FAN Z.

Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *J Biol Chem.* 2007 (B); 282:12104–12111.

ZHU J, GUO L, WATSON CJ, HU-LI J, PAUL WE.

Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol.* 2001; 166(12):7276-81.

ZOU W.

Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:295–307.

7 Anhang

7.1 Thesen zur Dissertation

1. Allergien stellen überschießende immunologische Reaktionen auf eigentlich nicht pathogene Antigene dar. Die Prävalenz der Erkrankung nimmt in den westlichen Ländern stetig zu. Die Reaktionen führen zu den klassischen Symptomen wie Rhinitis, Konjunktivitis, Urticaria und/oder Asthma bronchiale.
2. Interleukin-4 stellt das zentrale Zytokin beim allergischen Geschehen dar. Es induziert die Allergie-spezifischen Reaktionen wie die Aktivierung der T_H2 -Zellen, den Isotypwechsel in B-Zellen hin zur IgE-Synthese und die Bindung des Immunglobulins an Mastzellen. Die Konzentrationen des Zytokins sowie die Zahlen IL-4-synthetisierender Zellen zeigen sich im Blut allergischer Patienten erhöht.
3. Regulatorische T-Zellen wirken inhibitorisch auf andere Zellen des Immunsystems. Sie werden in natürliche T_{regs} , welche im Thymus entstehen und adaptive T_{regs} , die in der Peripherie induziert werden, eingeteilt. Gemein ist beiden Untergruppen, dass sie IL-10 und TGF- β synthetisieren und darüber immunsupprimierend wirken.
4. Bei allergischen Erkrankungen konnte eine Dysbalance zwischen immunsupprimierenden regulatorischen T-Zellen und T_H2 -Effektorzellen gezeigt werden. Zudem ist die immunregulatorische Funktion der T_{regs} bei Allergikern gestört. Diese Funktionsstörung ist IL-10-unabhängig.
5. Adaptive T_{regs} , so genannte T_R1 -Zellen, können in vitro aus $CD4^+$ T-Zellen mittels Stimulation von CD3 und CD46 generiert werden. CD46 ist ein Oberflächenmolekül, welches auch in vivo von Erregern und Tumorzellen genutzt wird, um Immunsuppression auszulösen. Eine Induktion der adaptiven T_{regs} in vivo durch diesen Mechanismus wird vermutet, ist jedoch nicht bewiesen.
6. Granzym B ist ein zytotoxisches Enzym, welches schnell und effektiv den Zelltod herbeiführt. Es wird vor allem von den zytotoxischen T-Zellen synthetisiert, um infizierte oder defekte Zellen zu eliminieren. Für $CD8^+$ T-Zellen wurde bereits eine IL-4-induzierte Suppression der Granzym-B-Synthese gezeigt.
7. Adaptive regulatorische T-Zellen synthetisieren Granzym B, welches ihnen zytotoxisches Potential verleiht. Dies wurde unter anderem auch anhand der T_R1 -Zellen festgestellt, die durch Stimulation von CD3 und CD46 aus naiven $CD4^+$

Zellen induziert werden. Diese Tatsache wurde unter hiesigen Laborbedingungen erneut bestätigt.

8. Granzym-B-vermittelte Funktionen der T_{regs} konnten bereits im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, Tumorc Clearance und Transplantationen gezeigt werden. Die Bedeutung bei allergischen Erkrankungen stand noch aus. Um diese Lücke zu schließen wurde die Beeinflussung der Granzym-B-Synthese der T_{regs} durch Interleukin-4 analysiert.
9. Interleukin-4 hemmt die Granzym-B-Synthese in adaptiven regulatorischen T-Zellen konzentrationsabhängig. Die inhibitorische Wirkung zeigte sich ebenfalls in einer reduzierten Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen. Es konnte so ein Mechanismus aufgezeigt werden, der zu einer reduzierten Funktion der T_{regs} im allergischen Milieu beiträgt.
10. Im Gegensatz zur Granzym-B-Synthese zeigte sich die IL-10-Sekretion der adaptiven T_{regs} unbeeinflusst von dem T_H2 -Zytokin IL-4.

7.2 Publikation

BRATKE K, **GOETTSCHING H**, KUEPPER M, GEYER S, LUTTMANN W, VIRCHOW JC.

Interleukin-4 suppresses the cytotoxic potential of in vitro generated, adaptive regulatory CD4 T cells by down-regulation of granzyme B.

Immunology 2009 Jul; 127(3):338-44.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Lübeck, 01.07.2011

Hilke Göttching